



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE VYBRANÝCH
METABOLITŮ NA SYROVÁTKOVÉM SUBSTRÁTU**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF SELECTED METABOLITES ON WHEY SUBSTRATE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Gadová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0976/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Martina Gadová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Biotechnologická produkce vybraných metabolitů na syrovátkovém substrátu

Zadání diplomové práce:

V rámci předložené práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) screening mikrobiálních producentů průmyslově významných metabolitů – ethanolu, kyseliny mléčné a lipidů
- 2) charakterizace a zpracování syrovátky a příprava médií s obsahem syrovátky
- 3) kultivace vybraných kmenů na syrovátce, vyhodnocení výtěžku metabolitů a spotřeby substrátu
- 4) bilance biotechnologických procesů

Termín odevzdání diplomové práce: 19.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Martina Gadová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zaoberá posúdením možnosti biotechnologického využitia odpadu, srvátky. Skúma obsahové zloženie lyofilizovanej srvátky, optimalizáciou kyslej hydrolýzy srvátky a následnej prípravy kultivačných médií s rôznym obsahom a úpravou srvátky. Cieľom práce je aj screening mikrobiálnych producentov biotechnologicky zaujímavých metabolitov z hľadiska ich rastu a produkcie vybraného metabolitu na srvátkových médiách. Substráty a vyprodukované metabolity boli analyzované pomocou UHPLC-PDA-RI a GC-FID a množstvo mikrobiálnych lipidov bolo stanovené grafimetricky. Boli študované kvasinky rodu *Saccharomyces*, *Metschnikowia* a baktérie rodu *Lactobacillus* za účelom produkcie etanolu, mikrobiálnych lipidov a kyseliny mliečnej. Najvyššia produkcia sa u kvasiniek dosiahla na srvátkovom médiu obsahujúcom hydrolyzovanú laktózu a u baktérii srvátkové médium bez hydrolýzy.

ABSTRACT

The submitted master thesis deals with assessment of the possibility of using of cheese whey for biotechnological production. Study content composition of lyophilized whey, optimization of acid hydrolysis and preparation of cultivating mediums with different content and treatment of cheese whey. Between the aims of this thesis belong also screening of microbial producers, interesting for biotechnology and looks at their growth and production of selected metabolites of cultivation mediums containing cheese whey. All substrates and produced metabolites were examined with UHPLC-PDA-RI and GC-FID: Amount of produced microbial lipids was determined by gravimetric analysis. Examined microorganisms belonged to yeast genus *Saccharomyces*, *Metschnikowia* and bacterial genus *Lactobacillus* and its focused on production of ethanol, microbial lipids and lactic acid. The highest yields with using yeasts were obtained using production medium containing hydrolysed lactose in cheese whey. The highest production, in case of bacteria, was obtained using non-hydrolysed, untreated cheese whey production medium.

KLÚČOVÉ SLOVA

Srvátka, kysla hydrolýza, etanol, kyselina mliečna, lipidy, kvasinky, baktérie

KEY WORDS

Cheese whey, acid hydrolysis, ethanol, lactic acid, lipids, yeast, bacteria

GADOVÁ, M. *Biotechnologická produkce vybraných metabolitů na syrovátkovém substrátu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 83 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Podakovanie

Rada by som poďakovala svojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za jej odborné vedenie, cenné rady, pripomienky a ochotu pri jej riešení. Rada by som poďakovala aj konzultantovi Ing. Viliamovi Hlaváčekovi za jeho pomoc v laboratóriu, trpezlivosť, za všetky odpovede na otázky a za predané skúsenosti. V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojej rodine, bez ktorej by táto diplomová práca vôbec nevznikla.

OBSAH

OBSAH	5
1 Úvod.....	8
2 Cieľ práce.....	8
3 Teoretická časť	9
3.1 Srvátka	9
3.1.1 Chemické zloženie srvátky.....	9
3.1.2 Srvátka ako polutant.....	10
3.1.3 Hydrolýza srvátky	10
3.2 Kvasinky.....	11
3.2.1 Rod <i>Saccharomyces</i>	13
3.2.2 Rod <i>Metschnikowia</i>	13
3.3 Baktérie.....	13
3.3.1 Mliečne baktérie	14
3.4 Rast a výživa mikroorganizmov	15
3.4.1 Rast mikroorganizmov	15
3.4.2 Výživa mikroorganizmov.....	16
3.4.3 Fyzikálno-chemické faktory ovplyvňujúce rast a metabolizmus mikroorganizmov	17
3.5 Glykolýza.....	20
3.6 Fermentácia	21
3.6.1 Etanolové kvasenie.....	21
3.6.2 Mliečne kvasenie.....	22
3.7 Mikrobiálna produkcia lipidov	23
3.8 Metódy analýzy substrátu a mikrobiálnych metabolitov.....	25
3.8.1 Extrakcia.....	25
3.8.2 Chromatografia.....	25
3.9 Využitie vybraných mikrobiálnych metabolitov	30
3.9.1 Etanol a mikrobiálne lipidy	30
3.9.2 Kyselina mliečna	31
4 Experimentálna časť.....	32
4.1 Chemikálie.....	32
4.1.1 Chemikálie použité pre kultiváciu.....	32

4.1.2	Chemikálie použité pre HPLC a GC	32
4.1.3	Ostatné chemikálie	32
4.2	Prístroje.....	33
4.3	Použité kmene mikroorganizmov	33
4.4	Metódy a postupy	34
4.4.1	Lyofilizácia srvátky.....	34
4.4.2	Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou	34
4.4.3	Stanovenie vlhkosti v lyofilizovanej srvátke	34
4.4.4	Elementárna analýza prvkov	35
4.4.5	Stanovenie obsahu cukrov pomocou kvapalinovej chromatografie.....	35
4.4.6	Deproteinizácia srvátky.....	35
4.4.7	Hydrolýza laktózy obsiahnutej v srvátke	35
4.4.8	Kultivácia mikroorganizmov.....	36
4.4.9	Rastové krivky.....	39
4.4.10	Veľkokapacitná kultivácia v bioreaktore	39
4.4.11	Izolácia a stanovenie metabolitov a substrátov	40
5	Výsledky a diskusia.....	43
5.1	Charakteristika srvátky	43
5.1.1	Obsahové zloženie srvátky.....	43
5.1.2	Elementárna analýza	44
5.2	Rastové charakteristiky.....	44
5.2.1	Kalibračná závislosť hodnoty absorbancie na množstve biomasy	44
5.3	Hydrolýza laktózy obsiahnutej v srvátke.....	48
5.3.1	Optimalizácia množstva kyseliny chlorovodíkovej	48
5.4	Vplyv prítomnosti soli na produkciu vybraného metabolitu na rôznych produkčných médiách	49
5.4.1	Kultivácia kvasiniek rodu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za účelom produkcie etanolu	49
5.4.2	Kultivácia <i>Lactobacillus planatarum</i> za účelom produkcie kyseliny mliečnej	52
5.4.3	Kultivácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i> za účelom produkcie lipidov	54
5.5	Veľkokapacitná kultivácia v bioreaktore.....	61
5.5.1	Kultivácia <i>S.cerevisiae</i> 6646 na produkčnom médiu s obsahom nedeproteinovanej hydrolyzovanej srvátky.....	61

5.5.2 Kultivácia <i>M. andauensis</i> na produkčnom médiu nedepróteínovanej hydrolyzovanej srvátky	63
5.5.3 Kultivácia <i>L. plantarum</i> na produkčnom médiu neupravovanej srvátky s prídavkom soli	65
6 Záver	67
7 Použitá Literatúra	68
8 Zoznam použitých skratiek	72
9 Prílohy	73
Príloha 1: Rastové charakteristiky	73
Príloha 2: Kultivácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	76
Príloha 3: Percentuálne zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	77

1 ÚVOD

Výroba syra predstavuje v súčasnom modernom svete dôležitú časť mliekarenského priemyslu. Na trhu existuje obrovské množstvo druhov syrov, či už dlho zrejúcich, klasických, nezrejúcich, korenených, plesnivých alebo dokonca aj takých, aké len človeku prídu na um. Nie je teda vôbec prekvapivé, že podľa štatistiky až 40 % z vyprodukovaného mlieka v Európskej únii je spotrebovaného práve na výrobu syrov. Avšak pri výrobe syra je získavaný aj vedľajší produkt, srvátka. Podľa literatúry pri výrobe jedného kilogramu syra je získaných 9 litrov srvátky a pri spomínanej vysokej produkcii syrov činí, podľa odhadov, ročný zisk srvátky len pre Európsku úniu viac ako 45 miliónov ton. Práve pre jej enormné množstvo a vysokú hodnotu biologickej a chemickej spotreby kyslíka predstavuje srvátka v súčasnosti environmentálny problém. Podľa predpisov je zakázané srvátku vypúšťať do vodných tokov a dokonca aj do mestskej kanalizácie. Jej špecializované odstránenie prináša nežiadajú finančnú záťaž pre výrobcov. Za účelom zníženia nákladov na odstránenie srvátky bolo vymyslených množstvo využití srvátky avšak aj napriek snahe je v súčasnosti stále značné množstvo srvátky, ktorá sa nevyužíva a je nevyhnutné ju odstrániť ako odpad. Jednou zo zaujímavých ideí je možnosti premeny srvátky na hodnotnejší produkt. To zahŕňa využitie srvátky ako substrátu pre vhodné mikroorganizmy za účelom získania hodnotného produktu. V súčasnosti bolo spravených už mnoho pokusov a publikovaných niekoľko publikácií zaoberajúcich sa touto problematikou, avšak nájdenie najvhodnejšej metódy spracovania a následne zvolenie vhodného mikroorganizmu na produkciu hodnotného produktu vyžaduje mnoho času a úsilia.

V predloženej diplomovej práci bola práve idea využitia srvátky ako lacného odpadného substrátu pre získanie produktu s vyššou pridanou hodnotou, motiváciou na jej tvorbu.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom prezentovanej diplomovej práce je zoznámenie sa odpadným produktom srvátka a jej problematikou, možnostiach spracovania a posúdenie možnosti biotechnologického využitia srvátky ako odpadného substrátu a zdroja živín pre mikroorganizmy.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Srvátka

Srvátka je vedľajší produkt, ktorý vzniká vo výrobe rôznych syrov, tvarohu a priemyselného kazeínu. Je to žltá-zelená, nutrične bohatá tekutina zostávajúca po vyzrážaní kazeínu z mlieka pomocou syridiel. V závislosti na použitej technike odstránenia kazeínu z mlieka (použitom syridle) rozlišujeme sladkú a kyslú srvátku. Sladká srvátka pochádza z výroby väčšiny typov syrov a určitých typov kazeínov, a má pH približne 5,6. V tomto prípade sa ako syridlo používa zmes proteolytických enzýmov. Druhý typ srvátky má pH 4,5 a vzniká pri zrážaní kazeínu buď prídavkom organických alebo minerálnych kyselín, prípadne aktivitou baktérií rodu *Lactobacillus*. Tento proces sa používa pri výrobe tvarohu a priemyselnej výrobe väčšiny kazeínu [1] [2] [3].

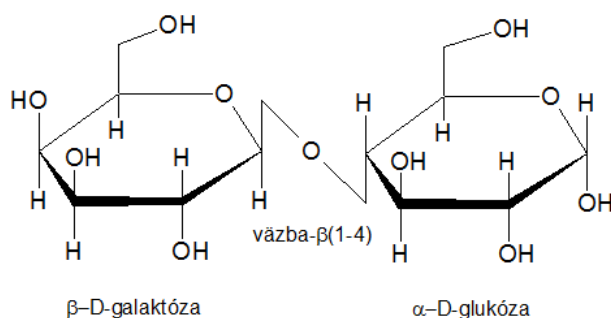
3.1.1 Chemické zloženie srvátky

Zloženie srvátky značne kolíše v závislosti na zložení mlieka a predovšetkým na použitých podmienkach výrobného procesu. Srvátka z prevažnej väčšiny obsahuje vodu (približne 93 % z celkového objemu) a následne látky z pôvodného mlieka ako sú laktóza, proteíny, minerály, kyselina mliečna a tuky. Obsahuje taktiež minoritný podiel látok ako sú citrónová a mliečna kyselina, vitamíny skupiny B a dusíkaté zlúčeniny neproteínovej povahy ako močovina a kyselina močová. Žltkavé sfarbenie tekutiny je spôsobené prítomnosťou vitamínu B2 (riboflavín) [2][3][4].

Tabuľka 1 Zloženie srvátky [5]

Zložky	Sladká srvátka (g/L)	Kyslá srvátka (g/L)
Celkový obsah pevných látok	63,0-70,0	63,0-70,0
Laktóza	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteíny	6,0-10,0	6,0-8,0
Vápnik	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfát	1,0-3,0	2,0-4,5
Laktát	2,0	6,4
Chloridy	1,1	1,1

Laktóza je tvorená α -D-glukózou a D-galaktózou, viď Obrázok 1. Má jednu voľnú poloacetalovú skupinu a teda je to redukujúci cukor. Obsah laktózy v kyslej srvátke je nižší z dôvodu jej premeny na kyselinu mliečnu, avšak obsah soli je vyšší kvôli zvýšenému podielu rozpusteného vápniku vplyvom kyslého prostredia [4][6].



Obrázok 1 Štruktúra laktózy

3.1.2 Srvátka ako polutant

Podľa odhadov, produkcia srvátky v EU prevyšuje 45 miliónov ton za rok a objem vyprodukovanej srvátky tvorí až približne 80-90 % objemu spracovávaného mlieka. Veľký podiel svetovo vyprodukovanej srvátky je stále likvidovaný ako odpad, hoci už bolo preskúmaných a popísaných niekoľko spôsobov jej využitia. Srvátka ako odpadný produkt predstavuje značný environmentálny problém najmä pre jej organický obsah a pre veľké produkované objemy v súčasnosti. Má vplyv na chemickú a fyzikálnu štruktúru pôdy vedúci k zníženiu úrodnosti poli a vyčerpávaniu rozpusteného kyslíka z vodných tokoch. Všeobecne platí, že na 1 kg vyrobeného syra je vyprodukovaných približne 9 L srvátky. Srvátka vykazuje biochemickú spotrebu kyslíka (BOD) $30\text{--}50\text{ g L}^{-1}$ a chemickú spotrebu kyslíku (COD) $60\text{--}80\text{ g L}^{-1}$. Za takto vysoké hodnoty BOD a COD je z majoritnej časti zodpovedná laktóza, pretože po odstránení proteínov dochádza k zníženiu COD srvátky len približne o 10 g L^{-1} . V minulosti spôsoby likvidácie srvátky zahrňovali pumpovanie do riek, jazier či oceánov, zalievanie jaskýň alebo rozlievanie na polia a v neposlednom rade aj kŕmenie prežúvavcov. Moderné časy priniesli povedomie o záťaži pre životné prostredie spôsobenej srvátkou. Ako následok tohto povedomia sa prijali predpisy zakazujúce jej vypúšťanie do vodných tokov a dokonca aj do mestskej kanalizácie, ktorej konvenčné ošetrovanie nie je vhodné a neprináša dostatočnú redukciu záťaže spôsobenej srvátkou. Technológie pre biologické šetrenie odpadných vôd môžu pomôcť pri bezpečnej likvidácii srvátky, avšak tieto technológie sú drahé. Z tohto dôvodu je likvidácia srvátky jedným z hlavných problémov mliečneho priemyslu, pretože jej odstránenie je spojené s finančnou záťažou. S cieľom rozvoja riešenia bezpečnej likvidácie srvátky, je potreba pozeráť sa na srvátku aj ako potenciálny zdroj výrobkov s pridanou hodnotou a nie len ako odpadný produkt [2] [5] [7] [8].

3.1.3 Hydrolýza srvátky

Počet mikroorganizmov, ktoré sú schopné spracovávať priamo laktózu, je oveľa nižší ako množstvo organizmov metabolizujúcich glukózu a galaktózu. Ako riešenie sa naskytuje hydrolýza laktózy v srvátke na jej monoméne jednotky, ktoré sú priamo a efektívne fermentované. Hydrolýza môže byť vykonaná dvoma spôsobmi: enzymaticky a chemicky [2][10].

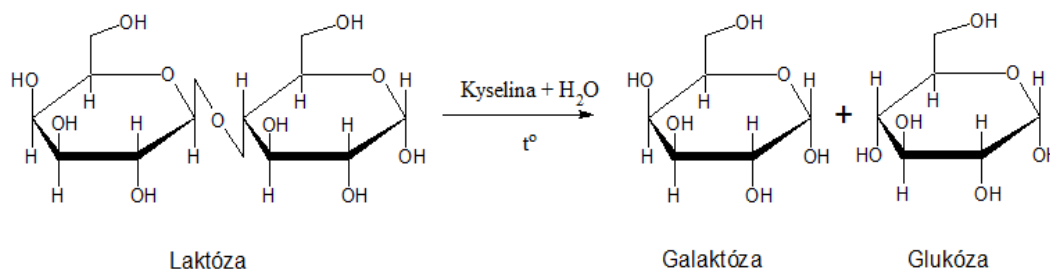
3.1.3.1 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza je výrazne preferovanejším spôsobom hydrolýzy laktózy. Hydrolýza je realizovaná pomocou enzýmu laktázy (β -galaktozidázy), ktorý štiepi glykozidickú väzbu. Doteraz bolo navrhnutých a testovaných množstvo zdrojov enzýmu, konfigurácií reaktorov a procesov. Hydrolýza enzýmom voľne disociovaným v roztoku nie je ekonomicky

výhodným spôsobom prevedenia, a to kvôli ekonomickej stránke, pretože to znemožňuje opätovné použitie enzýmu a značne zvyšuje produkčné náklady. Alternatíva je proces s imobilizovaným enzýmom na rôznom podklade alebo polymerizáciou získaný nerozpustný enzým. Medzi hlavné nevýhody tohto spôsobu hydrolýzy patrí polymerizácia glukózy a galaktózy za tvorby oligosacharidov, limitácia prenosu hmoty vedúca k nízkej rýchlosti celého procesu a príliš vysoká cena pre produkciu výrobkov ako je etanol [2][9][10].

3.1.3.2 Chemická hydrolýza

Cenovo efektívnejšia metóda je hydrolýza katalyzovaná kyselinou. Proces je veľmi dobre charakterizovaný pre mliečne odpadové vody a čisté glykozidy. Kyslá hydrolýza zahŕňa zahrievanie s jednoduchými reagentmi (kyselinami). Hydrolýza môže byť katalyzovaná pomocou anorganických kyselín, ako je napríklad kyselina chlorovodíková a kyselina sírová, a klasicky za teplôt vyšších ako 100 °C. Mechanizmus v prvom kroku zahŕňa ionizáciu laktózy pomocou protónu z kyseliny za formovania SH^+ . Druhý krok reakcie je rýchlosť limitujúci a je to dekompozícia disacharidu na dve monoméne jednotky, viď Obrázok 2 [9][10].



Obrázok 2 Schéma chemickej hydrolýzy laktózy

Monosacharidy môžu byť ďalej degradované na nežiaduce látky. Množstvo vedľajších reakcií závisí, okrem iných vecí, na zložení. Vysoká teplota generuje produkty hydrolýzy, ktoré sú inhibítory pre kvasinky. Následná neutralizácia kyselín neutralizačnými činidlami zvyšuje iónovú silu a osmotický tlak, čo môže znížiť aktivitu kvasiniek, preto je nutné poznať faktory ovplyvňujúce fyziologický stav organizmu. Côté a kolektív publikovali, že pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej, za nízkych teplôt, je možné dosiahnuť vznik na hexózy bohatý roztok s minimálnym množstvom vedľajších produktov. Prevedením reakcie za teplôt nižších ako 100 °C je značne eliminované hnednutie, spôsobené Maillardovými reakciami, a taktiež tvorba oligosacharidov [9][10].

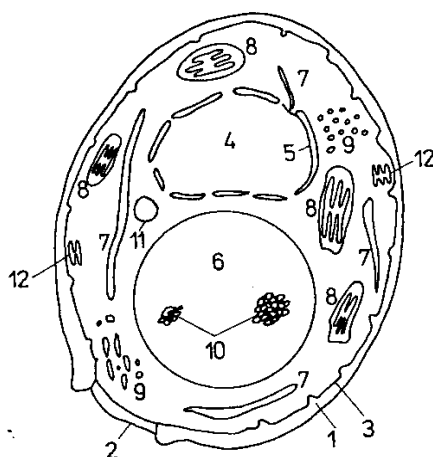
3.2 Kvasinky

Kvasinky sú eukaryotické mikroorganizmy patriace do skupiny húb. Sú heterotrofné, väčšinou jednobunkové, aeróbne alebo fakultatívne anaeróbne. Ich názov bol odvodený od ich schopnosti skvasovať sacharidy za tvorby etanolu a oxidu uhličitého. Veľkosť eukaryotickej bunky je spravidla väčšia ako bakteriálnej bunky, obvykle dosahujúca rozmer 3- 15 μm . Tvar buniek je daný najmä rodovou príslušnosťou, ale taktiež je ovplyvňovaný kultivačnými podmienkami. Najčastejšie tvary sú rotačný elipsoid, guľatý alebo pretiahnutý tvar [11] [12].

Eukaryotické bunky sú o mnoho zložitejšie ako prokaryotické a pozostávajú z množstva subceluárnych štruktúr, ako jadro obklopené jadrovým obalom, hladké a drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a vakuoly [6][13].

Bunková stena je rigidná, udávajúca výsledný tvar bunke a dovoľujúca odolávať zmenám osmotického tlaku, ktorý sa môže vyskytnúť v extraceluárnom prostredí. Kvasinky majú v bunkovej stene lipidy, polysacharidy, mannan a fosfát. Pod bunkovou stenou je periplazmatický priestor a následne cytoplazmatická membrána obklopujúca cytoplazmu. Táto membrána je klasická dvojvrstvová biologická membrána majoritne tvorená fosfolipidmi a glykolipidmi. Obsahuje predovšetkým prenášačové sústavy, integrálne proteíny alebo proteínové komplexy zodpovedajúce za výmenu látok medzi prostredím a bunkou. Cytoplazmatická membrána je aj miestom syntézy niektorých zložiek bunkovej steny a iných vonkajších štruktúr [12] [13] [14] [15] [16].

Cytoplazma je vysoko viskózný koloidný roztok, ktorý v bunke vyplňuje priestor medzi organelami. V cytoplazme sa odohráva množstvo chemických reakcií nevyhnutných pre existenciu bunky. Za ústrednú časť buniek sa považuje jadro sústreďujúce chromozómy a teda DNA bunky. Je oddelené od cytoplazmy jadrovou membránou a DNA sa vyskytuje v jadierku obvykle v spojení s bielkovinami ako deoxyribonukleoproteín. Mitochondrie sú semiautonómne organely, ktoré obsahujú vlastnú DNA, a prebieha v nich dýchací reťazec a tvorba ATP a tiež katabolický proces mastných kyselín. Ribozómy sú zodpovedné za syntézu bielkovín. Môžu byť buď voľne v cytoplazme alebo viazané na endoplazmatické retikulum (ER), ktoré je uložené v okolí jadra a je definované ako systém trubíc a cisterien zapojené do sekrečnej dráhy. ER sa podieľa aj na transporte a ukladaní medziproduktov metabolizmu. Hladké ER (bez ribozómov) sa podieľa na syntéze steroidov. Do sekrečnej dráhy je zapojený aj Golgiho aparát, v ktorom prebieha balenie, triedenie a proteínov a lipidov. Taktiež sú v bunke membránové vaky ako lyzozómy a vakuoly [6][12][14][16].



Obrázok 3 Stavba bunky kvasinky: 1 – bunková stena, 2 – jazva zrodu, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 – jadro, 5 – jadrová membrána, 6 – vakuola, 7 – endoplazmatické retikulum, 8 – mitochondria, 9 – glykogén, 11 – lipidy, 12 – Golgiho aparát [17]

Vo všeobecnosti sú kvasinky schopné rásť a fermentovať v pH rozmedzí 3,5 – 6,0 a teplotách 28 – 35 °C. Počas fermentácie vysoká koncentrácia glukózy v médiu inhibuje syntézu enzýmov zapojených v citrátovom cykle a cytochrómov z dýchacieho reťazca cez efekt známy ako glukózová represia. V dôsledku toho je mitochondriálny oxidatívny metabolizmus obmedzený [1] [13].

3.2.1 Rod *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae

Sú to kvasinky značne rozšírené v prírodnom prostredí a slúžia ako dôkladne preštudovaný a často využívaný modelový organizmus vo fyziologických a genetických štúdiách. Mnohými štúdiami bolo preukázané, že sa jedná o nepatogénny druh. Prejavujú sa výraznými fermentačnými schopnosťami a sú používané v mnohých odvetviach. *S. cerevisiae* využívajú glukózu, galaktózu, maltózu a sacharózu, avšak nie sú schopné spracovávať laktózu [1] [19].

3.2.2 Rod *Metschnikowia*

Rod *Metschnikowia* je známy multilaterálnym pučaním a tvorbou rudimentárneho mycélia. V prípade tohto rodu sa vo vrecku vyvíjajú 1-2 ihlicovité askospóry. Do súčasnosti bolo izolovaných 6 druhov, ktoré sa vyskytujú vo vodnom prostredí, pôde, na ovocí, kvetoch alebo ako parazity bezstavovcov [19].

Metschnikowia pulcherrima

Iným názvom *Candida pulcherrima*, je druh kvasinky, ktorý produkuje červenohnedé farbivo nekarotenoidovej povahy s príhodným názvom pulcherrimin. Má veľké guľaté chlamydospóry s olejovitou kvapkou. Najčastejšie sa vyskytuje na plodoch a kvasiacich muštoch [19].

Metschnikowia andauensis

Metschnikowia andauensis je druh kvasinky fyziologicky a morfológický podobný *M. pulcherrima* a je taktiež schopný produkcie červenohnedého farbiva pulcherrimin. Hojne sa vyskytuje ako parazit u húseníc [20].

3.3 Baktérie

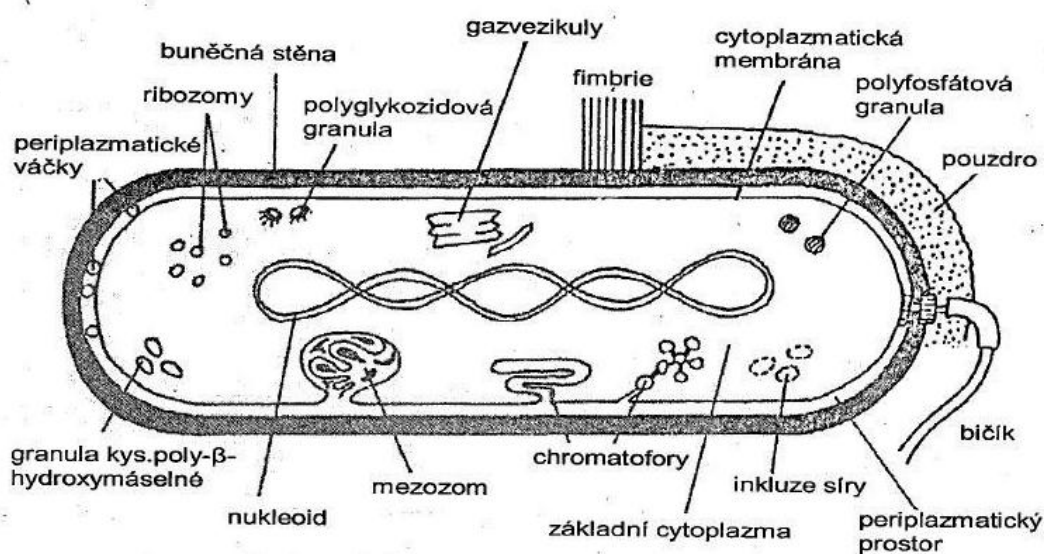
Baktérie patria medzi prokaryotické mikroorganizmy. Prokaryotická bunka je charakteristická svojou jednoduchou stavbou, ktorých štruktúra je rozlíšená na prokaryotické jadro, cytoplazmu, plazmatickú membránu a bunkovú stenu. Základným znakom prokaryotického jadra je, že nie je ohraničené membránou proti cytoplazme a pozostáva z jednej, najčastejšie kruhovej, dvojreťazovej molekuly DNA. Táto molekula DNA nikdy neobsahuje históny a tvorí približne 10 % objemu bunky. Jadro môže byť spojené s cytoplazmatickou membránou najmenej na dvoch miestach. Mnoho baktérií obsahuje aj plazmidy, DNA vo forme malých kruhových molekúl, ktoré nie sú nevyhnutné pre existenciu bunky [12] [14] [16].

Cytoplazma vyplňuje vnútorný priestor bakteriálnej bunky. Je to koncentrovaný roztok obsahujúci množstvo zlúčenín ako sú vitamíny, aminokyseliny, enzýmy, metabolity, soli

a iné. Zaujímavou charakteristickou vlastnosťou cytoplazmy je schopnosť prechádzať zo sólu do gélu a späť. Vnútro bunky nie je rozdelené membránami a neobsahuje takmer žiadne organely, výnimkou sú ribozómy, na ktoré je viazaná biosyntéza proteínov. Počet ribozómov v bakteriálnej bunke je premenlivý, kontrolovaný a závisí na potrebe syntézy proteínov [12] [16].

Cytoplazmatická membrána oddeľuje cytoplazmu od vonkajšieho prostredia. Jej štruktúra je podobná biologickým membránam iných organizmov, teda dvojvrstva fosfolipidov, do ktorej sú zakomponované bielkoviny. Medzi útvary cytoplazmatickej membrány patria aj mezozómy a chromatofóry [12].

Väčšina baktérií sa vyznačuje bunkovou stenou na povrchu, ktorá plní funkciu skeletu bunky a kompenzuje osmotický pretlak utvorený vo vnútri bunky. Základom bunkovej steny je peptidoglykan (murein). Na základe toho rozdeľujeme baktérie na grampozitívne a gramnegatívne. Peptidoglykanová zložka u grampozitívnych baktérií má mnoho vrstiev a na vonkajšej strane sú naviazané molekuly kyseliny teikovoovej, v ktorých sa striedajú zvyšky cukru a kyseliny fosforečnej. Gramnegatívne baktérie disponujú ďalšou vonkajšou membránou s vysokou priepustnosťou. U niektorých baktérií je bunková stena pokrytá ešte puzdrom a z bunkového povrchu môžu vyčnievať bičíky a fimbrie [12] [16].



Obrázok 4 Stavba bakteriálnej bunky [12]

3.3.1 Mliečne baktérie

Mliečne baktérie sú historicky definované ako mikroaerofilné, grampozitívne organizmy, ktoré produkujú kyselinu mliečnu. Mliečne baktérie netvoria spóry a sú uznané za GRAS mikroorganizmy („Generally Regarded As Safe“). Táto klasifikácia zahŕňa rôzne industriálne dôležité rody ako *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, a *Lactobacillus sp.* Mliečne baktérie sú schopné metabolizovať bežné uhlíkové substráty ako glukózu, fruktózu, laktózu, maltózu a sacharózu [1] [21] [22].

3.3.1.1 Rod *Lactobacillus*

Je to rod mliečnych baktérií, ktorý na pevnej kultivačnej pôde vytvára nepohyblivé tyčinky. Tieto baktérie sú náročné na rastové látky a ich hodnota pH nesmie klesnúť pod 4. Mnoho kmeňov *Lactobacillus* má využitie v mliekarenskom priemysle a sú bežne prítomné v ľudskom tele, napríklad, ústnej dutine alebo v ženskej vagíne [19].

Lactobacillus plantarum

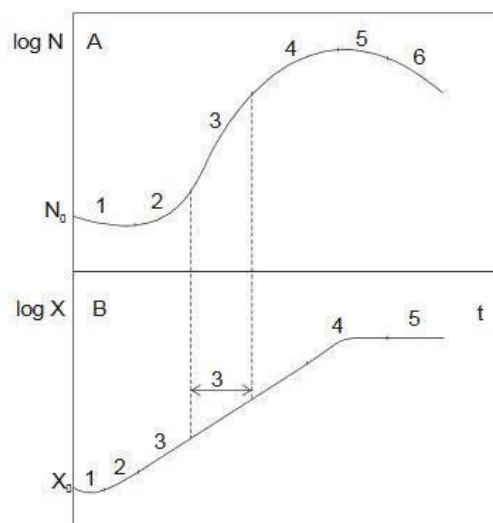
Tvorí tyčinkovité bunky o dĺžke 4 μm . Vyskytuje sa jednotlivo alebo v krátkych retiazkach s tendenciou zhlukovať sa. *Lactobacillus plantarum* je mikroaerofilný a homorefermentatívny druh, čo znamená, že z prevažnej väčšiny tvorí len kyselinu mliečnu. V prírode sa vyskytuje najmä na rastlinách a majoritné využitie nachádza v poľnohospodárstve pri očkovaní siláže a ako zmesná kultúra v cukrovarníctve. Menšinové uplatnenie má aj v mliekarenskom priemysle pri výrobe syrov [19].

3.4 Rast a výživa mikroorganizmov

3.4.1 Rast mikroorganizmov

Rast a rozmnožovanie mikroorganizmov v konečnom objeme živného média neprebíha stále rovnakou rýchlosťou. Po prenesení buniek z kultúry do nového živného média nedochádza ihneď k ich maximálnej rastovej rýchlosti. Taktiež v určitom štádiu dochádza k spomaleniu rastu, a to v dôsledku vyčerpania živín, tvorby toxických látok, prípadne tvorby metabolitov alebo kombináciou týchto faktorov. Semilogaritmickým znázornením rastu mikrobiálnej populácie dostávame rastovú krivku. Rastová krivka na ose x znázorňuje čas [h] a na ose y je logaritmus počtu živých buniek. Podľa jej priebehu môžeme rozdeliť na 6 fáz:

- lag fáza – obdobie kedy sú bunky prenesené do nového prostredia a dochádza k prispôbovaniu sa novému prostrediu, často to vedie k poklesu počtu živých buniek
- fáza zrýchleného rastu – krátke obdobie, kedy sa bunky v médiu začínajú množiť narastajúcou rýchlosťou
- exponenciálna fáza – všetky bunky sú živé a majú konštantnú veľkosť, počet buniek rastie exponenciálne s časom, je to obdobie kedy bunky najrýchlejšie rastu a množia sa
- fáza spomaleného rastu – krátke obdobie kedy dochádza k poklesu multiplikačnej rýchlosti
- stacionárna fáza – narastá počet organizmov, čím sa znižuje koncentrácia živín a zvyšuje sa množstvo metabolitov. To vedie buď k intoxikácii alebo hladovaniu, čo zapríčiňuje inhibíciu rastu a postupné odumieranie. Stacionárna fáza je charakteristická tým, že rýchlosť množenia je v rovnováhe s rýchlosťou odumierania buniek.
- fáza odumierania – odumieranie môže byť pomalé alebo rýchle [17] [23].



Obrázok 5 Rastová krivka. 1 lag fáza, 2 fáza zrýchleného rastu, 3 exponenciálna fáza, 4 fáza spomaleného rastu, 5 stacionárna fáza, 6 fáza odumierania [23]

Ak preniesieme bunky v exponenciálnej fáze rastu z jedného média do nového kultivačného média o rovnakom zložení, pokračujú v rozmnožovaní s približne rovnakou generačnou dobou, teda bez zreteľnej lag fázy. Tohto faktu sa využíva pri prenose kultúry do produkčného média [17].

3.4.2 Výživa mikroorganizmov

Mikroorganizmy k svojej existencii potrebujú okrem vhodného prostredia aj prítomnosť nevyhnutných živín. Živiny musia pokrývať všetky požiadavky mikroorganizmov na energiu a na tvorbu stavebných kameňov pri syntéze bunkovej hmoty. Navyše, okrem zdroja energie musí prostredie obsahovať zdroje biogénnych prvkov, ktoré tvoria súčasť bunkovej hmoty. Najväčšie požiadavky sú kladené na makrobiogénne prvky C, H, N, P, S a kationy K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Živné médium musí taktiež obsahovať dostatočné množstvo vody, pretože všetky reakcie prebiehajúce v živých organizmoch vyžadujú vodné prostredie a určitú vodnú aktivitu. K látkam potrebným k správne rastu mikroorganizmov taktiež patria rastové faktory. Sú nevyhnutné najmä u auxotrofných organizmov. Hrajú úlohu prekurzorov biosyntézy makromolekúl a koenzýmov. Najčastejšie sú to vitamíny, puríny, pyrimidíny, aminokyseliny [17] [24].

3.4.2.1 Zdroj uhlíka

Zdroj uhlíka je nevyhnutný na syntézu aminokyselín, organických báz, sacharidov, lipidov a iných nízkomolekulárnych látok, potrebných na tvorbu skeletu makromolekúl. Vhodným zdrojom sú zlúčeniny využívané ako zdroj energie, tj. sacharidy, alkohol, organické kyseliny a iné. Súčasne sú ako stavebné kamene z prostredia využívané aj zlúčeniny, ktoré sú súčasťou bunkovej hmoty, a to predovšetkým aminokyseliny, vitamíny, purínové a pyrimidinové bázy. Zdrojom uhlíka je zároveň zabezpečený aj zdroj vodíka [17] [24].

3.4.2.2 Zdroj dusíka

Dusík je využívaný na tvorbu amino- a iminoskupín, ktoré sa nachádzajú v aminokyselinách,

organických bázach a hexozamínoch. Najvhodnejším zdrojom sú pre heterotrofné organizmy amónne soli, najčastejšie vo forme síranov alebo fosfátov. U niektorých mikroorganizmov môžu byť použité aj dusičnany alebo jednotlivé aminokyseliny [17] [24].

3.4.2.3 Zdroj fosforu

Je nevyhnutný pre správne fungovanie buniek, jeho nedostatok spomaľuje rast aj kvasný proces. Prijem fosfátu prebieha vo forme anorganických fosfátov [17] [24].

3.4.2.4 Zdroj síry

Síra je prevažne využívaná na syntézu sírnych aminokyselín a bielkovín obsahujúcich síru. Ako zdroj síry sa najčastejšie používajú sírany, pridávané hlavne ako síran amónny, avšak mikroorganizmy môžu využívať aj sírne aminokyseliny, a to hlavne ako stavebné kamene pri syntéze bielkovín [17] [24].

3.4.2.5 Zdroj katiónov

Z ostatných biogénnych prvkov sú mikroorganizmami vyžadované katióny ako horčík, sodík, vápnik, draslík, železo, chlór, prípadne stopové množstvá zinku, mangánu, molybdénu, kobaltu, medi a bóru. Najčastejšie sa do média pridávajú vo forme solí a v malých množstvách, ktoré boli zistené experimentálne. Katióny Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sú potrebné len vo veľmi nízkych koncentráciách a dostávajú sa do živných médií ako kontaminácia z použitých chemikálií a vody. V prostredí je nevyhnutné zachovať určitý pomer katiónov/ aniónov, pretože nadbytok jedného iónu môže inhibovať transport iného iónu cez membránu, alebo môže dochádzať k inhibícií enzýmov [17] [24].

3.4.3 Fyzikálno-chemické faktory ovplyvňujúce rast a metabolizmus mikroorganizmov

Životná aktivita a vývoj mikroorganizmov sú značne závislé na vonkajšom prostredí. Pre správny rast a rozmnožovanie je nevyhnutné, aby prostredie obsahovalo dostatočné zdroje živín a využiteľnú energiu, ako aj vhodné fyzikálne, biologické a chemické podmienky. Faktory vonkajšieho prostredia môžu vyvolať mikrobicídny účinok, čo znamená ireverzibilnú inhibíciu s letálnym koncom, alebo mikrobistatický účinok, ktorý je typicky reverzibilný a teda po odznení nepriaznivého faktoru bunky pokračujú v klasických životných pochodoch. Citlivosť a odozva mikroorganizmu na vonkajšie prostredie je závislá na veku populácie, druhovej príslušnosti a či je bunka vo vegetatívnej alebo forme spóry, kedy je odolnejšia voči vonkajším fyzikálnym a chemickým zmenám prostredia [12].

Vo všeobecnosti má zmena vonkajšieho fyzikálno-chemického faktoru prostredia vplyv na životne dôležité funkcie a systém bunky. Zvyčajne sú to:

- narušenie štruktúry a funkcie bunkovej steny
- porušenie semipermeability cytoplazmatickej membrány
- zmeny v štruktúrach cytoplazmy
- inhibícia aktivity enzýmov, vrátane zablokovania metabolizmu
- zásah do biosyntetických pochodov [12].

Životaschopnosť mikrobiálnej bunky je najčastejšie ovplyvňovaná fyzikálnymi a chemickými faktormi [12].

3.4.3.1 Teplota

Teplota vonkajšieho prostredia je jedným z hlavných faktorov ovplyvňujúcich rýchlosť rozmnožovania a metabolizmu mikroorganizmov. Pre každý mikroorganizmus sú kľúčové 3 body, a to minimálna, optimálna a maximálna teplota. Pri optimálnej teplote sa bunky rozmnožujú najrýchlejšie a majú najvyššiu metabolickú aktivitu. Minimálna teplota je teplota, pri ktorej sa populácia rozmnožuje najnižšou detekovateľnou rýchlosťou. Vo všeobecnosti pri znížení teploty pod optimálnu dochádza k poklesu metabolizmu, avšak teploty nižšie než optimálne prežíva väčšina kultúr. Prežitie mikroorganizmov znížením teploty až pod nulu sa využíva pri uchovávaní kultúr. K uchovávaniu dochádza metódou rýchleho zmrazovania na teploty až -190°C a následne je možné uchovávať tieto mikroorganizmy až po dobu niekoľkých rokov bez straty vitality [12][17].

Naproti tomu, pri zvýšení teploty nad optimálnu, dochádza k prudkému poklesu rozmnožovania a až k jeho zastaveniu a následnému usmrteniu buniek. Tento prudký pokles je pôsobený denaturáciou enzýmov obsiahnutých v bunke. Avšak krátkodobé zvýšenie teploty nad maximálnu teplotu vedie k výkyvom metabolizmu spôsobených teplotným šokom. Pri tomto šoku dochádza k syntéze proteínov teplotného šoku („heat shock proteins“, HSP) [17].

3.4.3.2 pH

Rast a biochemická činnosť sú silno ovplyvnené koncentráciou vodíkových iónov v prostredí (pH). Podobne ako u teploty aj u pH platí, že takmer každý mikroorganizmus má svoje minimálne, optimálne a maximálne hodnoty pH, umožňujúce vykonávať základné životné funkcie. Vonkajšie pH ovplyvňuje regulačné procesy a tiež odolnosť buniek k zvýšeným teplotám. Rôzne mikrobiálne druhy sa rozmnožujú len v obmedzenom rozmedzí pH. U väčšiny plesní je rozmedzie pH pre optimálny rast široké, zatiaľ čo u kvasiniek a baktérií je toto rozmedzie podstatne užšie. Väčšina baktérií rastie v neutrálnom alebo mierne alkalickom pH (pH optimum v rozmedzí 6,5 – 7,5, mliečne 5,5 až 6,5), kvasinky vyžadujú kyslé prostredie (pH optimum 4 – 6,5) a optimálne pH plesni je okolo neutrálneho bodu, avšak ako už bolo spomenuté, rozmnožujú sa v širokom rozmedzí pH (1,2 až 11,0) [12] [17].

3.4.3.3 Vodná aktivita

V živej bunke prebiehajú všetky chemické reakcie výhradne vo vodnom prostredí a práve preto musí byť voda prítomná v dostatočnom množstve v kvapalnom stave. Pretože molekuly vody môžu voľne difundovať cez cytoplazmatickú membránu, je nevyhnutný dostatok vody aj v okolí bunky, aby bunka nestratila vnútrobunkovú vodu. Vtedy dochádza k dehydratácií, zníženiu aktivity metabolizmu a k zmene veľkosti protoplastu. Dlhodobý nedostatok voľnej vody je pre väčšinu mikrobiálnych buniek letálny [12] [17].

Potreba vody pre bunku sa kvantitatívne vyjadruje vodnou aktivitou a_w . Je vyjadrená ako pomer tlaku vodných pár nad roztokom k tlaku vodných pár nad destilovanou vodou pri totožných podmienkach. Pre veľmi zriedené roztoky, vzťah vodnej aktivity ku koncentrácií rozpustenej látky sa vyjadruje nasledovne:

$$a_w = \frac{N_w}{N_w + N_s} \quad (1)$$

N_w predstavuje počet molekúl vody a N_s počet molov rozpustenej látky. Čistá voda má $a_w = 1$ a zo stúpajúcou koncentráciou rozpustených látok vodná aktivita klesá. Odhliadnuc od minoritnej skupiny baktérií, väčšina baktérií je schopná rozmnožovania pri vodnej aktivite v rozmedzí 0,99 až 0,93, zatiaľ čo minimálna vodná aktivita umožňujúca ich rozmnožovanie sa pohybuje v okolí 0,91 až 0,88 [17].

1.1.1.1 Tlak

Hydrostatický tlak do 10 MPa u väčšiny mikroorganizmov nemá významný vplyv na životné funkcie. Zastavenie rastu a rozmnožovania dochádza až pri prekročení hodnoty tlaku 10 MPa a v prípade zvýšenia tlaku na 30 – 40 MPa je delenie úplne zastavené a dochádza k zmenám v metabolizme. V prírode sa však nachádzajú aj organizmy, ktoré sa prispôbili a sú schopné prežívať v prostredí o vysokom tlaku, takéto mikroorganizmy nazývame barofilné [12] [17].

Okrem hydrostatického tlaku má kľúčový vplyv na aktivitu bunky osmotický tlak. Vnútny osmotický tlak je daný koncentráciou rozpustených látok v cytoplazme a u väčšiny buniek sa pohybuje v rozmedzí 0,1–0,6 MPa. Pretože najčastejšie je vyššia koncentrácia látok vo vnútri, vzniká na bunkovej membráne napätie, ktoré je fyziologické. V prípade vysokého rozdielu koncentrácií dochádza najčastejšie vyrovnávaním príjmom/výdajom vody. Ak sa bunka ocitá v hypertonickom prostredí (vyšší tlak vonkajšieho prostredia) bunke je znemožnený príjem vody a voda odchádza do prostredia. Pri dlhodobom vystavení takémuto prostrediu dochádza k plazmolýze (zmenšeniu veľkosti protoplastu) a tento jav sa nazýva aj fyziologické sucho. U eukaryotických buniek sú zmeny v osmotickom tlaku riešené odlišným spôsobom, a to využitím vakuol. Vakuoly sú schopné veľmi rýchlo reagovať na zmeny osmotického tlaku [12].

1.1.1.2 Oxidoredukčný potenciál

Zvyčajne sa tvrdí, že rast anaeróbných a aeróbných mikroorganizmov závisí len na prítomnosti molekulárneho kyslíka, avšak v skutočnosti ide o súčet všetkých oxidačných a redukčných látok, ktoré sú prítomné. Tento súčet je vyjadrený oxidačne redukčným potenciálom, ktoré vykazuje každé prostredie. K najdôležitejším oxidačným činidlám patrí kyslík, dusičnany, železité ióny, peroxidy a najpodstatnejšie redukčné látky sú železnaté ióny, vodík, zlúčeniny so sulfhydriovou skupinou alebo s dvojitými väzbami. Oxidačné látky vedú k tvorbe kladného oxidoredukčného potenciálu a naopak redukujúce látky vedú k tvorbe záporného potenciálu. Aeróbne organizmy vyžadujú prítomnosť kyslíka, čo znamená pozitívny oxidoredukčný potenciál (+200 až +400 mV). V dôsledku aeróbného metabolizmu a spotreby kyslíku dochádza k poklesu oxidoredukčného potenciálu prostredia, a preto je nevyhnutné neustále prevzdušňovanie kultivačného média. V prípade anaeróbných mikroorganizmov pôsobí kyslík a pozitívny oxidoredukčný potenciál nepriaznivo až letálne, pretože vyžadujú hodnotu nižšiu ako -200 mV [12] [17].

Oxidoredukčný potenciál je možné v istom rozmedzí meniť pridaním redukadiel alebo

oxidovadiel. Pridaním látok ako kyseliny askorbovej, cysteínu alebo kyseliny tioglykovej dôjde k zníženiu oxidoredukčného potenciálu [12].

1.1.1.3 Žiarenie

Elektromagnetické vlnenie o rôznych vlnových dĺžkach má odlišné fyziologické účinky na mikroorganizmy. Infračervené žiarenie a viditeľné svetlo samy o sebe nemajú významný negatívny vplyv na mikroorganizmy [17].

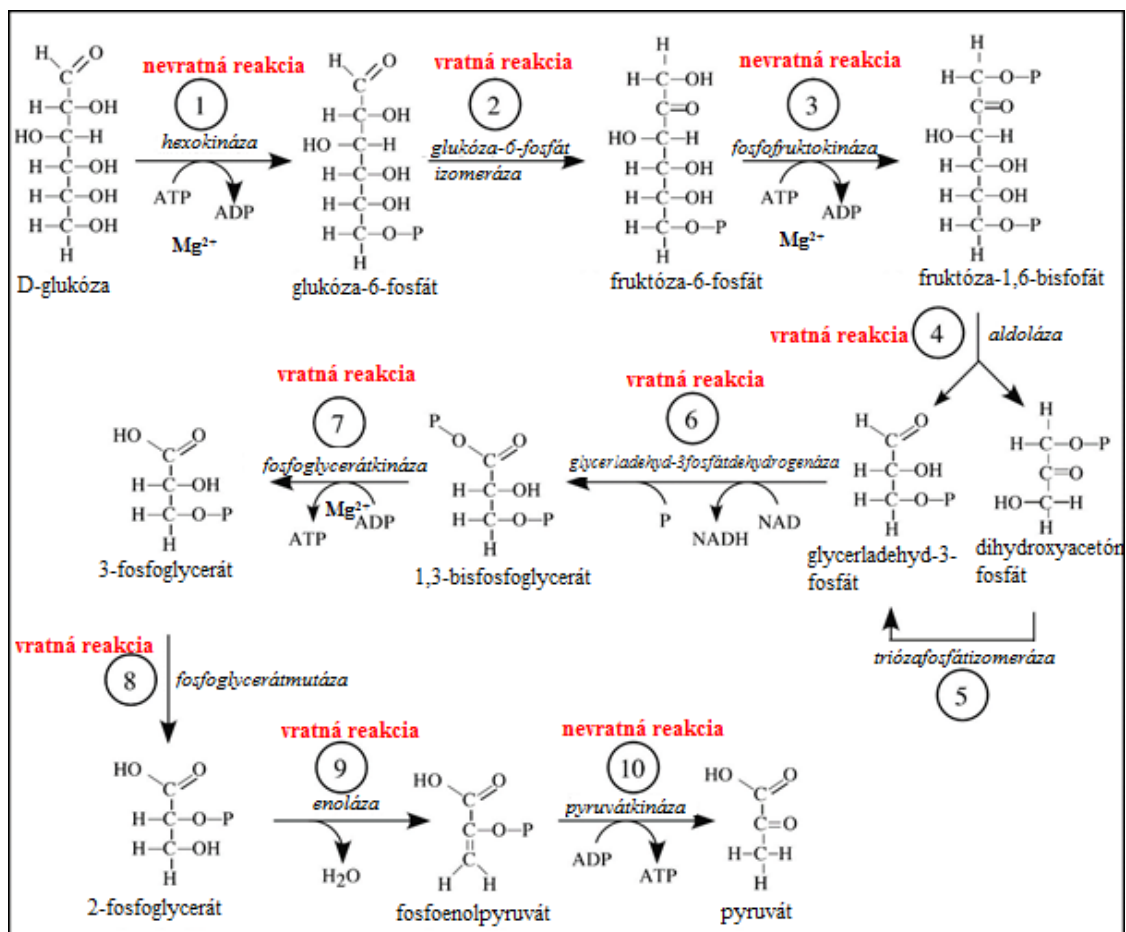
Ultrafialové žiarenie má silné mutagénne a letálne účinky na mikroorganizmy. Najväčšie účinky má žiarenie o vlnovej dĺžke, ktoré je najviac absorbované nukleovými kyselinami, 265 nm. Hlavnou príčinou takéhoto účinku UV žiarenia je tvorba kovalentných väzieb medzi susednými pyrimidínmi nukleových kyselín [17].

Žiarenie o vlnovej dĺžke kratšej než 10 nm, kde spadá Roentgenové, kozmické a γ -žiarenie majú silné letálne a mutagénne účinky. Ich účinok spočíva najmä v ich pôsobení na citlivé molekuly bunky (DNA) a pôsobením radikálov oxiranov. β -žiarenie má podobné účinky na mikroorganizmy ako γ -žiarenie, avšak jeho prenikavosť hmotou je o niečo menšia [17].

3.5 Glykolýza

Glykolýza, iným názvom Embden-Meyerhofova metabolická dráha, je základným katabolickým procesom sacharolytických mikroorganizmov. Hlavným cieľom glykolýzy je uvoľnenie energie uloženej v molekulách sacharidov. Je to dej prebiehajúci v takmer vo všetkých bunkách. Glykolytická dráha bola objasnená v roku 1940 a podieľala sa na tom rada vedcov [6] [17].

Hlavným princípom glykolýzy je premena monosacharidických hexóz na pyruvát. K premene dochádza za spotreby dvoch molekúl ATP, kedy sa z glukózy vytvorí energeticky bohatá fruktóza-1,6-bisfosfát. Tá je následne štiepaná na 2 triózy, ktoré podliehajú niekoľkým premenám a zároveň každá trióza predáva 2 vodíky pyridinovému nukleotidu. Na dvoch miestach sú premeny spriahnuté so systémom ADP a chemická energia sa ukladá vo forme ATP. Výsledkom premeny hexózy na dve molekuly pyruvátu je vznik dvoch makroergických zlúčenín ATP a dvoch NADH. Pyruvát slúži ako substrát pre ďalšie energie, pretože obsahuje ešte značné množstvo energie (viac ako 75 % energie hexózy). Celkové schéma glykolýzy je znázornené na Obrázok 6 [6].



Obrázok 6 Celkové schéma glykolýzy [18]

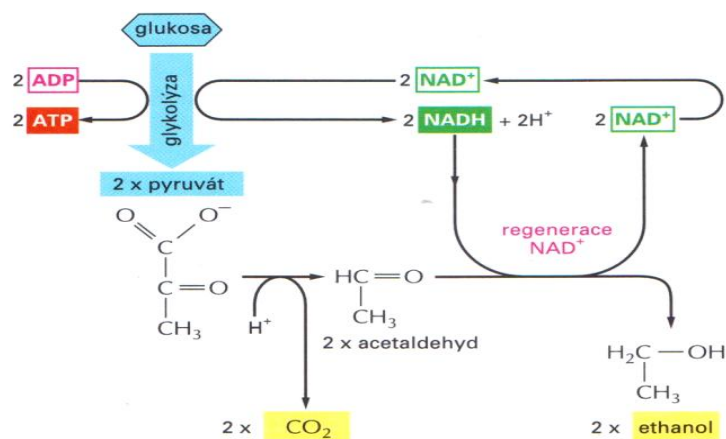
3.6 Fermentácia

Základným rozdielom medzi respiračným a fermentačným metabolizmom je v koncových akceptoroch elektrónov (atómov vodíka) a s tým spojené i množstvo uvoľnenej energie uloženej do molekúl (ATP). Pri fermentácii sú primárnymi donormi vodíkov redukované organické zlúčeniny a konečnými akceptormi vodíkov sú organické látky v menej redukovanej forme. Dochádza k neúplnému rozkladu substrátu a preto je množstvo uvoľnenej energie nižšie. Hlavným účelom fermentácie je tvorba ATP procesom substrátová fosforylácia. Najčastejšími substrátmi sú sacharidy, ich deriváty a medziprodukty o rôznej dĺžke reťazca, od monosacharidov až po polysacharidy. Pri fermentácii sacharidov sa najčastejšie jedná o predĺženie alebo modifikáciu glykolýzy. Produktmi sú jedno- až štvoruhlíkové produkty – alkoholy, karboxylové kyseliny, ketóny, oxid uhličitý a molekulový dusík [6].

3.6.1 Etanolové kvasenie

Kvasinky sú schopné utilizovať rôzne substráty a v anaeróbných podmienkach metabolizujú glukózu na etanol primárne skrz glykolýzu. Etanolové kvasenie je fermentácia vychádzajúca z glykolýzy (Embden-Meyerhof-Parnasovej dráhy). Pri etanolovom kvasení dochádza najskôr k dekarboxylaácii pyruvátu na acetaldehyd, aby sa získal lepší vodíkový akceptor. Premena je poháňaná enzýmom pyruvátdekarboxyláza, ktorý dekarboxyluje bez súčasnej oxidácie. Následnú redukciu acetaldehydu na etanol zabezpečuje enzým alkoholdehydrogenáza. Tým

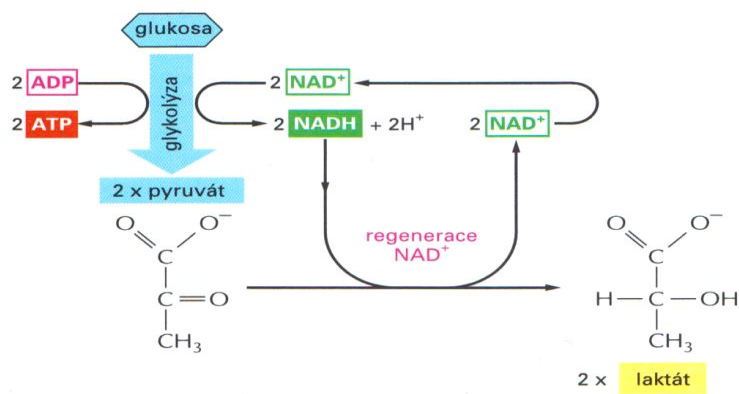
vznikajú z jednej molekuly hexózy dve molekuly etanolu a dve molekuly oxidu uhličitého s čistým ziskom dvoch molekúl ATP [1] [6] [17]:



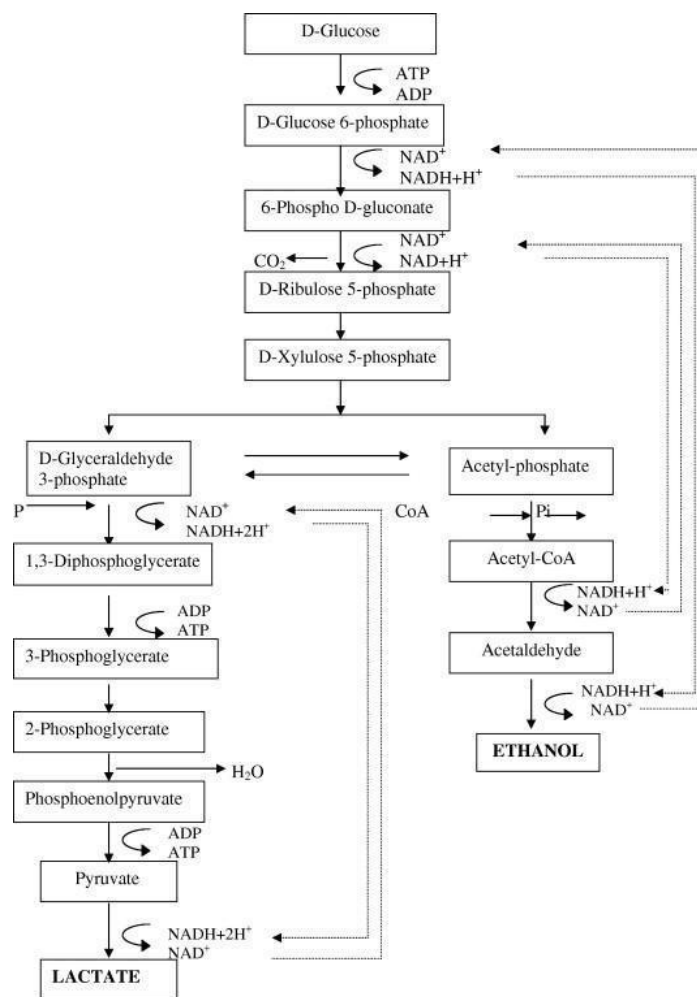
Obrázok 7 Etanolové kvasenie [25]

3.6.2 Mliečne kvasenie

Mliečne kvasenie je fermentácia vychádzajúca z glukózy. Je najjednoduchším riešením, pretože pri tvorbe laktátu je akceptorom sám pyruvát. Premenu pyruvátu na laktát zaist'uje enzým laktátdehydrogenáza. Rozdeľuje sa na heterofermentatívne a homofermentatívne mliečne kvasenie. Produktom homofementatívneho kvasenia je väčšinou D-laktát, zatiaľ čo pri heterofermentatívnom kvasení vzniká okrem laktátu aj etanol a CO₂. Baktérie využívajú reakcie pentózového cyklu pri heterofermentatívnom kvasení a prostredníctvom EMP využívajú substrát u homofermentatívneho kvasenia. Kyselina mliečna je produkovaná širokým spektrom mikroorganizmov obsahujúcim baktérie, plesne, riasy a taktiež cyanobaktérie [1] [6] [26].



Obrázok 8 Homofermentatívne mliečne kvasenie [25]



Obrázok 9 Heterofermentatívne mliečne kvasenie [27]

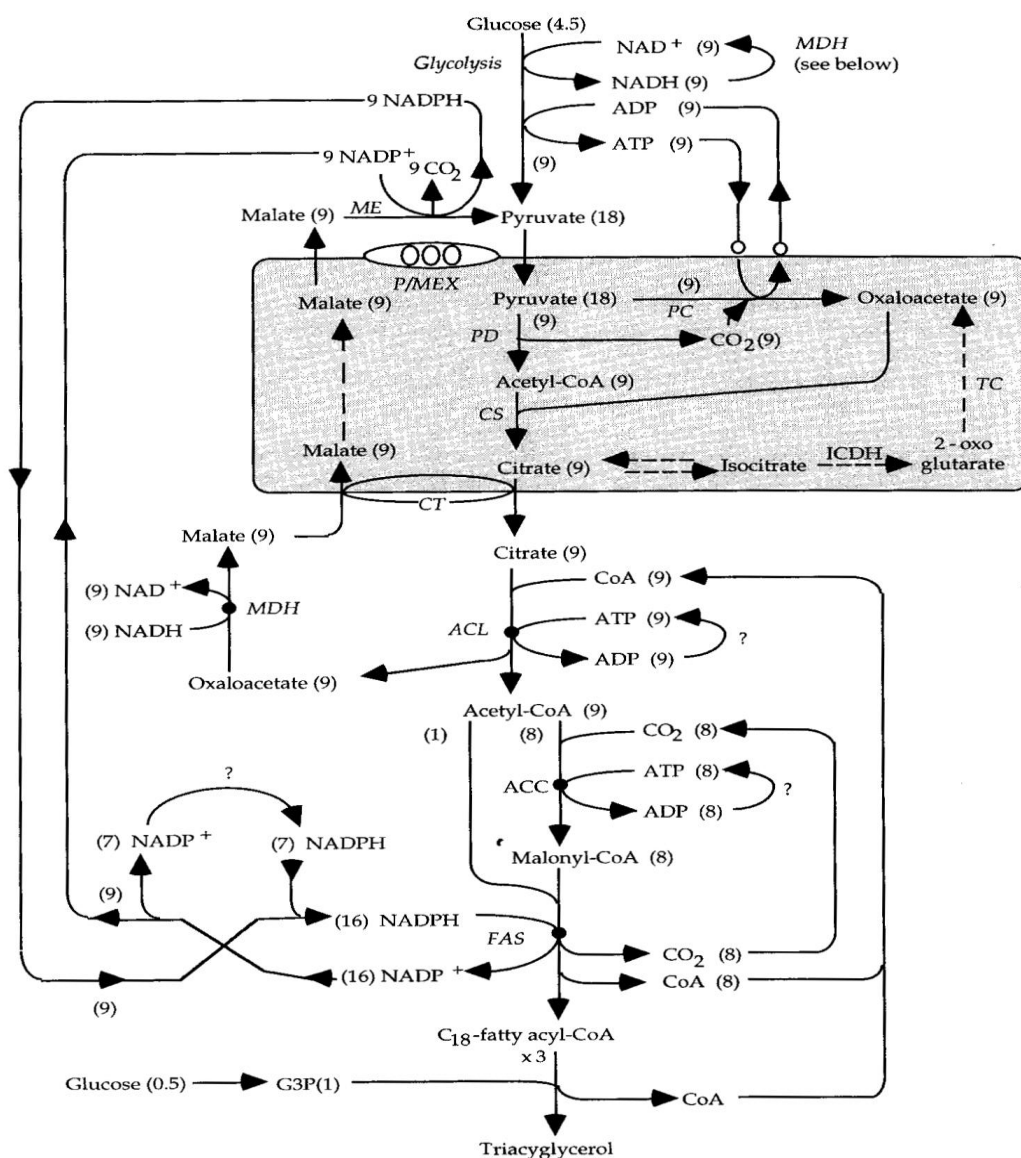
Kyselinu mliečnu je možné produkovať aj chemickou cestou, avšak produkcia pomocou mikrobiálnej fermentácie ma množstvo výhod, ako je napríklad nízka spotreba energie v dôsledku miernych teplôt kultivácie. Ďalšou výhodou je široká dostupnosť lacných substrátov. Pri premyslenej produkcii sú využívané najčastejšie homofermentatívne baktérie. Napriek schopnosti produkcie kyseliny sú mliečne baktérie pomerne citlivé na prítomnosť kyseliny, preto je pri priemyselnej produkcii nutné tvoriacu kyselinu mliečnu neutralizovať [1] [26].

3.7 Mikrobiálna produkcia lipidov

Vybrané mikroorganizmy sú schopné produkcie rezervných lipidov nazývaných aj „single cell oils“ (SCO). Mikroorganizmy produkujúce rezervné lipidy sa nazývajú olejnaté a vo všeobecnosti sú schopné akumulovať 20 – 80 % lipidov. Z majoritnej časti sú to triacylglyceroly (TAG), kvasinky okrem TAG tiež produkujú medzi 2–10 % z celkových lipidov fosfolipidy s menším množstvom sterolov a sterolových esterov [28] [29].

Dráha akumulácie triacylglycerolov z glukózy znázorňuje formovanie lipidov v olejnatých mikroorganizmoch. U neolejnatých mikroorganizmoch kľúčový enzým, ATP-citrát lyáza, sa nevyskytuje a následne tvorba acetyl-CoA prebieha odlišnou cestou a nevedie k tvorbe lipogénneho stavu (akumulácii lipidov) [28].

Tvorba a akumulácia prebieha v stacionárnej fáze rastu, pri nadbytku uhlíkového zdroja a dôležitým faktorom podporujúcim tvorbu lipidov je limitácia vybranej živiny, najčastejšie dusíku, v médiu. Vyčerpaním dostupného dusíku je aktivovaný enzým AMP-deamináza, rozkladajúci AMP za účelom získania NH_3 pre bunku. Následne, ako výsledok dochádza k rapídному poklesu AMP a to je prvý hlavný spúšťač lipogénnej kaskády. AMP je aktivátor izocitrátdehydrogenázy a v jeho neprítomnosti dochádza k akumulácii citrátu a izocitrátu. Citrát je následne transportovaný do cytosolu a rozkladaný ATP-citrátlyázou, enzýmom špecificky prítomným u olejovitých mikroorganizmov. Rozkladom citrátu/ izocitrátu vzniká acetyl-CoA, ktorý slúži ako primer pre syntézu mastných kyselín. Okrem dodávky C_2 jednotiek, musí bunka navyše poskytovať NADPH ako redukčné činidlo. NADPH je získavané z metabolizmu oxalacetátu, cez malát na pyruvát. Okrem je to cesty môže byť časť NADPH dodávaná metabolizmom glukózy cez pentózofosfatovú dráhu. Predpokladá sa, že kyselina jablčná opúšťa mitochondrii pre neskoršie reakcie, a to v sérii spriahnutých transportných reakcií cez mitochondriálnu membránu [28] [29].



Obrázok 10 Biosyntéza triacylglycerolov z glukózy u oleogénnych mikroorganizmov [28]

Súhrnná syntéza a stechiometria reakcie je približne:



Z toho plynie, že v prípade, kedy glukóza nie je spotrebovávaná na tvorbu iných produktov, je čistý výťažok 32 g na 100 g glukózy [28].

3.8 Metódy analýzy substrátu a mikrobiálnych metabolitov

3.8.1 Extrakcia

Príprava vzoriek sa považuje za veľmi podstatnú časť pri kvalitatívnom a kvantitatívnom stanovení analytov vo vzorkách s komplexným zložením. Medzi jednu z často využívaných techník prípravy komplexných vzoriek patrí extrakcia. Extrakcia je v literatúre popísaná ako selektívny prechod zložky medzi dvoma nemiešateľnými fázami. Tieto fázy môžu byť buď obe kvapaliny, alebo kvapalina a tuhá fáza. Pri jednoduchej extrakcii dochádza k rozdeleniu vzorky na dve časti, pretože cieľom extrakcie je izolácia zložky od matrice, izolácia od rušivých elementov, odstránenie interferujúcej zložky alebo prípadne skoncentrovanie zložiek. V analytickej chémii sa najčastejšie používa extrakcia z vodnej fázy do organickej [30] [31].

Extrakcia kvapalina-kvapalina je jednou z najstarších využívaných pre-chromatografických techník. Pri tomto type extrakcie sú obe fázy kvapalina a ako už bolo spomenuté v úvode extrakcie, kvapaliny musia byť vzájomne nemiešateľné. V laboratórnej praxi to často znamená, že jedným rozpúšťadlom je voda a druhým rozpúšťadlom je organická fáza. Základný princíp je prechod rozpustenej látky v jednej fáze do druhej [30].

3.8.1.1 Extrakcia podľa Folcha

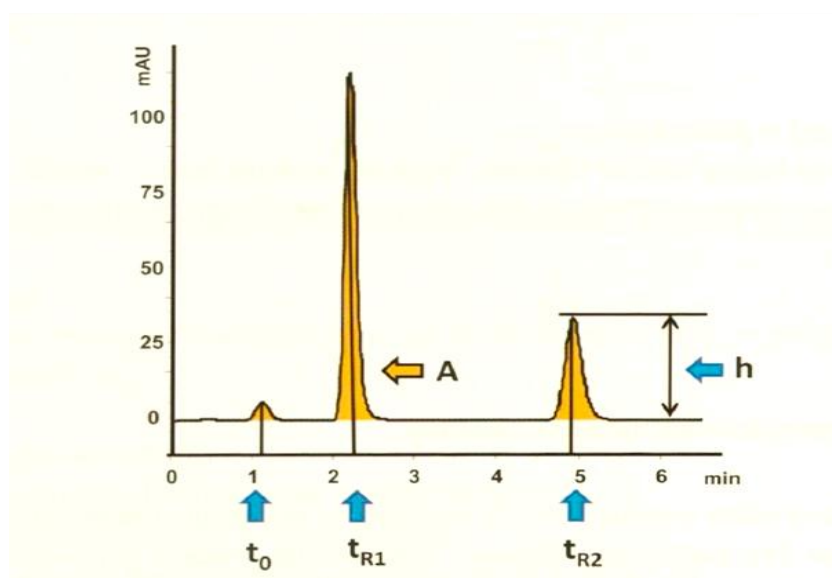
Možnosť extrakcie lipidov z biologických vzoriek pomocou chloroformu, metanolu a vody navrhli ako prví Folch a kol.. Táto metóda extrakcie je aj v súčasnosti považovaná za klasickú a najspoľahlivejšiu metódu kvantitatívnej extrakcie mikrobiálnych lipidov. Pri extrakcii je najprv využívaný roztok chloroformu a metanolu v pomere 2:1, do ktorého sú extrahované a rozpustené lipidy. Následne dvojfázový systém je vytvorený pridaním vody alebo soľného roztoku, kde prechádzajú polárne, nelipidické látky spolu s metanolom a dochádza k vymytiu všetkých nelipidických kontaminantov od extraktu. V spodnej fáze sa nachádza chloroform s extrahovanými lipidmi. Mnohokrát sa pri extrakcií používa roztok slabej soli NaCl/KCl/MgCl₂ aby si lipidy zachovali kyslý charakter a zostávali v chloroformovej fáze. Folch a kol. predkladajú možné vysvetlenie k zmene distribúcie rozdelenia lipidov v prítomnosti minerálnych soli. Lipidy extrahované ako soli po disociácii prechádzajú do vrchnej vodnej fázy a práve prítomnosť kationov Na, K, Ca, Mg zabraňuje disociácii lipidických soli a tým pádom presunu lipidov do spodnej fázy [32] [33].

3.8.2 Chromatografia

Chromatografia je všeobecný názov pre skupinu techník zameraných na separáciu zložiek zmesi na základe opakujúceho sa ustáľovania rovnováhy, na akomkoľvek mieste chromatografického lôžka, vyplývajúceho z ich rozdielnej interakcie medzi dvoma vzájomne nemiešateľnými fázami. Jedna z fáz je nepohyblivá, stacionárna (sorbent) s veľkým povrchom

a druhá fáza je mobilná, ktorá je v pohybe a v kontakte so stacionárnou fázou. Látka, ktorá má väčšiu afinitu k stacionárnej fáze, je silnejšie zadržiavaná touto fázou a preto je jej rýchlosť prestupu kolónou nižšia. Následne z kolóny vystúpi neskôr ako látka s menšou afinitou. Separácia a elucia jednotlivých zložiek je teda ovplyvnená povahou mobilnej a stacionárnej fáze. Chromatografická separácia môže prebiehať v rôznych systémoch buď v stĺpcovom (kolóna) alebo v plošnom usporiadaní (papier, tenká vrstva) [30] [34] [35].

Separované zóny analytov sú zaznamenané detektorom ako signál, ktorý je prevedený do podoby chromatogramu. Chromatogram je časová závislosť intenzity veličiny a je to elučná krivka (pík) s charakteristickým tvarom Gaussovej krivky, vid' Obrázok 11 [34].



Obrázok 11 Chromatogram, t_0 vyjadruje mŕtvy elučný čas kolóny, t_{R1} a t_{R2} retenčný čas príslušnej eluovanej látky[34]

Na základe toho, v akom skupenstve je mobilná fáza, rozlišujeme kvapalinovú chromatografiu, kde mobilná fáza je kvapalina a plynovú chromatografiu, kde mobilná fáza je plyn [35].

Retenčné charakteristiky a účinnosť chromatografického systému

Veľkosť zadržiavania látky v systéme je možné vyjadriť ako retenčný čas t_R , a je to základná charakteristická veličina pre každú delenú látku. Predstavuje čas, ktorý strávi látka v stacionárnej fáze, plus čas ktorý strávi látka v mobilnej fáze pri migrácii kolónou, nazývaný aj ako mŕtvy elučný čas. Mŕtvy elučný čas, t_0 je vyjadrený ako čas inertnej látky ktorá sa v stacionárnej fáze nezadržiuje. Retenčný čas je vyjadrený vzťahom:

$$t_R = t_0 + t'_R \quad (2)$$

a počíta sa od momentu nástreku vzorky až po maximum elučného píku [30] [34].

Následne je možné identifikovať zložky vzorky na základe zhody elučných časov s elučnými časmi štandardov a z výšky alebo častejšie plochy píku je možné stanoviť koncentráciu

analytu vo vzorke.

Retenčný faktor udáva pomer doby, ktorý látka strávi v stacionárnej a v mobilnej fáze a je možné ho vypočítať z retenčného času. Je nezávislý na rozmeroch kolóny [30]:

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

Lineárna rýchlosť mobilnej fáze je určená vzťahom [30]:

$$u_0 = \frac{L}{t_0} \quad (4)$$

kde L je dĺžka kolóny.

Základným cieľom chromatografie je dosiahnuť najlepšiu možnú separáciu za najkratší čas. Účinnosť kolóny hodnotí mieru rozširovania elučných zón rozdelených na danej kolóne a preto je ukazateľom kvality chromatografickej separácie. Účinnosť chromatografickej separácie je možné charakterizovať počtom teoretických poschodí kolóny N , ktorú je možné vyhodnotiť z elučného času t_R a zo šírky piku v základe (w_t) alebo v polovici výšky piku ($w_{t,1/2}$). Pre plnené kolóny je počet poschodí priamo úmerný dĺžke kolóny [30] [34]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_t} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{t,1/2}} \right)^2 \quad (5)$$

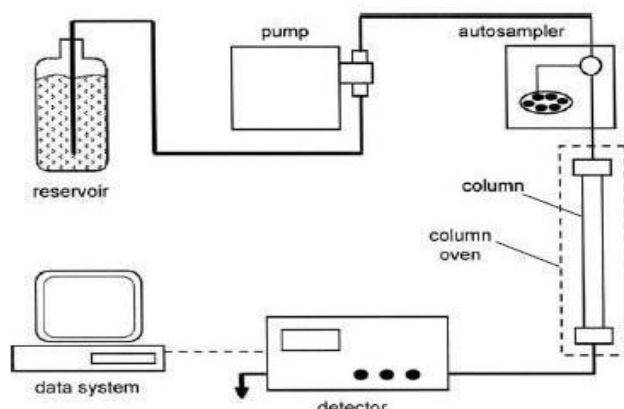
Výškový ekvivalent teoretického poschodia určuje úsek, kde dochádza k ustanoveniu rovnováhy v kolóne. Nezávisí na jej dĺžke, ale na kvalite chromatografickej kolóny, jej náplne a experimentálnych podmienkach. Najčastejšie je používaný na porovnávanie kolón o rôznych dĺžkach [30] [34]:

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

Základné usporiadanie chromatografického systému

Základné usporiadanie chromatografického systému je znázornené na Obrázok 12. Mobilná fáza sa nachádza v zásobníkoch a odtiaľ je čerpaná pomocou čerpadla skrz kolónu. Úlohou čerpadla je zaistenie stabilného prietoku a tlaku mobilnej fáze cez kolónu. Injektor (manuálny slučkový dávkovač alebo autosamplér) sa nachádza pred separačnou kolónou a zabezpečuje precízny nástrek vzorky na kolónu bez prerušenia stabilného prietoku mobilnej fáze. Za dávkovačom vzorky nasleduje samotná separačná kolóna, ktorá je zvyčajne umiestnená v termostate. Detektor, ktorý je umiestnený hneď na výstupe z kolóny, zodpovedá zaznamenávanie signálu v závislosti na zložení práve pretekajúcej kvapaliny. V základom usporiadaní moderného chromatografického systému nesmie chýbať kontrolná jednotka, spravidla počítať, pomocou ktorého sa ovláda celý separačný systém a slúži aj na

vyhodnocovanie signálu z analýz [34] [36].



Obrázok 12 Základné usporiadanie chromatografického systému [36]

3.8.2.1 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia je definovaná kvapalnou mobilnou fázou a stacionárna fáza je spravidla tuhá, avšak výnimkou sú dynamicky tvorené stacionárne fázy u typu kvapalinovej chromatografie – HILIC [30].

Vzorky u kvapalinovej chromatografie nemusia byť tepelne stále a mať vysoký tlak pár. Kvapalinová chromatografia umožňuje pestrú voľbu separačných systémov s odlišnými kombináciami mobilnej a stacionárnej fázy a je možné ju použiť takmer univerzálne pre širokú paletu látok [30].

Kvapalinová chromatografia môže slúžiť k preparatívnemu účelu, čo znamená k čisteniu a izolácii látok, ale aj k analýze zmesi látok. V súčasnosti najpreferovanejšou formou kvapalinovej chromatografie, pre analýzy látok, sú vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) alebo ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC). Obe techniky pracujú výhradne v elučnom móde, kontinuálnom usporiadaní a pri vysokých tlakoch. Pri HPLC je to pri tlaku do 40 MPa (400 bar) a u UHPLC je to od 100 – 150 MPa (1000-1500 bar). Analyzuje sa na kolónach 2 – 30 cm dlhých s vnútorným priemerom 0,1 – 6 mm, naplnených sorbentmi s veľmi jemnými časticami, u ktorých sa dosahuje pomerne vysokej účinnosti [30].

Detektory sú vždy umiestnené až za chromatografickou kolónou a poskytujú signál úmerný koncentrácií analytu. V kvapalinovej chromatografii sa štandardne používajú spektrofotometrické detektory pracujúce v UV a prípadne aj viditeľnej oblasti, teda v oblasti vlnových dĺžok 190 až 800 nm. Tieto detektory poskytujú odozvu úmernú schopnosti prítomnej látky absorbovať žiarenie. Spektrofotometrický detektor je schopný sledovať jednu vybranú vlnovú dĺžku. Delíme ich na detektory s fixnou vlnovou dĺžkou, s meniteľnou vlnovou dĺžkou, programovateľnou vlnovou dĺžkou alebo s diódovým poľom. K poslednej

skupine patria detektory PDA a DAD, ktoré snímajú celé spektrum v reálnom čase. Po prechode žiarenia mernou celou dochádza k jeho rozkladu holografickou mriežkou a jednotlivé žiarivé toky o určitej vlnovej dĺžke. Tieto žiarivé toky následne dopadajú na sériu fotodiód. Najstarším univerzálnym detektorom je refraktometrický, ktorý sa používa na analýzu látok neobsahujúcich chromofór. Príkladom takejto látky sú cukry. Funguje na princípe merania rozdielu indexu lomu medzi mernou celou, cez ktorú prechádza eluát z kolóny a referenčnou celou obsahujúcou čistú mobilnú fázu. Podľa konštrukcie rozlišujeme dva typy, a to deflexný (výchylkový) a reflexný (Fresnelov) refraktometrický detektor. Medzi ďalšie detektory používané u HPLC patria napríklad vodivostný detektor, fluorescenčný, elektrochemický alebo ampérometrický detektor a v neposlednom rade hmotnostný spektrometer [30] [34].

3.8.2.2 Plynová chromatografia

Ako už bolo spomenuté v úvode o chromatografii, plynová chromatografia používa ako mobilnú fázu plyn. Najčastejšie používané mobilné fázy sú vodík, hélium, dusík, argón a oxid uhličitý. Stacionárna fáza môže byť buď vysoko-viskózna, neprchavá kvapalina (GLC) alebo tuhá tepelne stabilná fáza, pri ktorej separácia funguje najmä na princípe adsorpcie (GSC). V plynovej chromatografii sú na trhu dostupné dva druhy separačných kolón: náplňové alebo kapilárne. U náplňových kolón je stacionárna fáza ukotvená na povrchu indiferentného nosiča a vyplňuje objem kolóny, spravidla na 70 %. Stacionárna fáza u kapilárnych kolón je buď vo forme tenkého filmu po stenách kolóny o hrúbke 0,1 – 1,0 μm , alebo vyplňuje objem kolóny. Stacionárnych fáz je známych niekoľko sto s veľkou variabilitou chemického zloženia, ale aj iných vlastností. V súčasnej dobe však došlo k obmedzeniu výberu a takmer výhradne sa používajú profesionálne pripravené kolóny, práve kvôli vysokej reprodukovateľnosti ich výroby a dostupnosti knižníc retenčných indexov pre identifikáciu látok [30] [35].

Pre túto techniku je dostupných niekoľko senzitívnych a prípadne aj prvkovo špecifických detektorov, ktoré dovoľujú pomerne nízke limity detekcie. Detektory by mali byť stabilné, lineárne a dostatočne senzitívne, aby detegovali koncentrácie v rozmedzí 10^{-6} – 10^{-9} g. Medzi univerzálne detektory patrí tepelne vodivostný detektor (TCD), ktorý meria rozdiel medzi tepelnou vodivosťou mobilnej fázy a vzorky. Jeho nevýhodou je nízky limit detekcie. Ďalší používaný je plameňovo ionizačný detektor (FID), kde neutrálne molekuly sú degradované a ionizované pomocou oxidácie v plameni (bohatom na vodík) medzi dvoma elektródami. V tomto detektore sú detegované zmeny v elektrickej vodivosti. Je to senzitívny univerzálny detektor, ktorého odozva je lineárna a dokáže pracovať aj pri vysokých frekvenciách, čo znamená že môže byť použitý na rýchle a ultrarýchle analýzy [35].

Medzi selektívne detektory patrí napríklad detektor elektrónového záchytu (ECD), ktorý deteguje len zlúčeniny schopné zachytávať elektróny alebo dusíkovo-fosforový detektor (NPD), používaný pre analýzu zlúčenín obsahujúcich dusík alebo fosfor. Selektívne detektory sú vysoko citlivé detektory [35].

Táto analytická metóda sa používa pre široký rozsah koncentrácií analytov, od stanovenia majoritných zložiek zmesi (>10 %) až po stopové množstvá v radoch ppb. Nanešťastie kritickým bodom plynovej chromatografie je nevyhnutnosť, aby všetky látky vstupujúce do

separačného systému (kolóny) boli v plynnej fáze. Táto požiadavka je zásadnou limitáciou tejto techniky, pretože určuje rozsah analyzovaných látok a ich kvantifikáciu. Vzorky pre plynovú chromatografiu musia byť tepelne stabilné a prchavé pod teplotou 300 °C. Z toho vyplýva, že približne 75 % známych zlúčenín nie je možné analyzovať pomocou plynovej chromatografie, práve kvôli vysokým teplotám varu alebo neprchavosti [30] [35]

Napriek tejto limitácii je plynová chromatografia považovaná za techniku s vyššou účinnosťou ako má HPLC. Dosahuje vyššie hodnoty čísla N (počet teoretických poschodí kolóny), čo má za výsledok lepšiu a alebo aj rýchlejšiu separáciu. Preto je táto technika preferovanejšia u plyných vzoriek a vzoriek s nízkym bodom varu [30] [35].

3.9 Využitie vybraných mikrobiálnych metabolitov

3.9.1 Etanol a mikrobiálne lipidy

Ropa je najviac spotrebávaným zdrojom energie na svete, prevyšujúcim spotrebu uhlia, zemného plynu, jadrovej, vodnej a obnoviteľnej energie. Produkty z ropy nás sprevádzajú každým dňom, avšak ropa nie je obnoviteľným zdrojom energie a pri tak vysokej spotrebe, aká je dosahovaná v dnešnom svete, sú jej zásoby veľmi rýchlo vyčerpávané. Navyše používaním ropy dochádza k zvyšovaniu koncentrácie skleníkových plynov v našom životnom prostredí. Práve paliva z obnoviteľných zdrojov sú pravdepodobne jednou z najlepších možností, ktoré by mohli viesť k náhrade ropy [38] [39] [40].

Myšlienka biopalív nie je nová, už Henry Ford navrhol model auta, ktoré malo pohon na etanol. Medzi biopalivá okrem etanolu patrí aj biodiesel (estery mastných kyselín a bioplyn. Pôvodne sa však myslelo, že produkcia biopalív nemôže naraziť na žiadne limitácie, pretože sú obnoviteľné. Nanešťastie sa zistilo, že potreba energie ďaleko prevyšuje priestor, na ktorom by bola potreba pestovať biomasu. A práve rovnováha medzi využitím biomasy ako zdroja potravy alebo paliva je to, čo robí tento relatívne jednoduchý proces komplikovanejším [38] [39] [40].

Prvá generácia biopalív zahŕňa produkciu rastlinnej biomasy, ktorá je následne transesterifikovaná pomocou nízkomolekulárnych alkoholov na obnoviteľné palivo. Práve obrovský priestor potrebný na pestovanie rastlinnej biomasy a súperenie o zdroj potravy priviedol vedcov k myšlienke druhej generácie biopalív, ktorá využíva lingocelulóзовé materiály. Avšak druhá generácia biopalív nie je komercializovaná v dnešnej dobe. Navyše bionafta produkovaná z olejnatých semien alebo živočíšnych tukov môže vyriešiť len malú časť súčasného dopytu po dopravných palivách bez prevýšenia negatív nad pozitívami [38] [39] [40].

Mikrobiálne lipidy majú množstvo výhod oproti rastlinám, ako je krátky životný cyklus, menej nárokov na priestor a produkcia neovplyvnená ročným obdobím. Lipidy, ktoré môžu byť vyprodukované olejovými mikroorganizmami, sa považujú za sľubných kandidátov na výrobu bionafty, pretože ich zloženie mastných kyselín je podobné zloženiu rastlinných olejov. Sú bohaté na špecifické polynenasýtené mastné kyseliny [38].

Okrem vyššie popísaného použitia mikrobiálnych lipidov pre výrobu biodieslu sú mikrobiálne lipidy používané v potravinových doplnkoch a na výživu dojčiat [38].

Etanol produkovaný fermentáciou zo srvátky môže byť použitý vo farmaceutickom, kozmetickom priemysle, alebo v chemickom priemysle ako priemyselné rozpúšťadlo a bezpochyby v potravinárskom a nápojovom priemysle. Veľmi atraktívnym využitím je jeho použitie ako alternatívne palivo. Výhodou etanolu vyprodukovaného zo srvátky je, že nie je vyrobený zo zdrojov potravy (ako napríklad kukurica) a nevyžaduje také predúpravy, ako v prípade etanolovej produkcie z celulóзовých materiálov. Navyše dochádza k zníženiu znečistenia premenou laktózy zo srvátky a produkcií etanolu súčasne [2] [3].

3.9.2 Kyselina mliečna

Tradičné využitie kyseliny mliečnej je v potravinárstve ako konzervant, aromatizačné činidlo či pH regulátor v šalátových dresingoch, nápojoch, instantných jedlách, spracovaní mäsa. Vo farmaceutickom priemysle našla uplatnenie ako napríklad pH regulátor alebo prírodný komponent liečiv. V neposlednom rade sa kyselina mliečna používa v priemysle detergentov ako odstraňovač vodného kameňa [3] [26].

V súčasnej dobe, kedy dochádza k rýchlemu vyčerpaniu fosílnych palív a stúpajú obavy o životné prostredie, prišli ľudia s myšlienkou recyklovateľných a degradovateľných plastov. Medzi ne patrí aj polymér kyseliny mliečnej. Optický čistá L- a D-kyselina mliečna sú prekurzormi pre produkciu biodegradovateľného polyméru kyseliny mliečnej, LA. Tento polymér je hlavnou zložkou ekologického plastu s vynikajúcou biokompatibilitou a spracovateľnosťou. Jedno z možných využití je v medicíne ako implantáty v rôznych tvaroch pre inžinierstvo kosti a tkaniva [26] [3].

Okrem PLA sa ako veľmi sľubný materiál javí polymér kyseliny mliečnej a glykolovej (PLGA). Považuje sa za jeden z najlepších biomateriálov pre ciele distribúciu liečiv. PLGA šitý na mieru je vhodný na krátkodobé uvoľňovanie liečiv v období 1 mesiaca alebo dlhodobé uvoľňovanie v období 6 mesiacov [3] [26].

Bohužiaľ veľkoobjemová výroba kyseliny mliečnej ešte nebola skomercializovaná. Zvyšujúci dopyt po tejto surovine prakticky znemožňuje jej výrobu z klasickej suroviny, ako je glukóza zo škrobu, hlavne kvôli cene a súťaženiu s potravinovými zdrojmi. Aby sa splnili požiadavky, cena produkcie PLA za kilogram by musela klesnúť pod 0,8 \$ US. Preto si veľkú pozornosť získali lacné, obnoviteľné zdroje uhlíka ako lignocelulóza alebo aj srvátka. V roku 2014, firma Cellulac, ako prvá, spustila industriálnu výrobu kyseliny mliečnej z deproteinovanej srvátky obsahujúcej laktózu pomocou GMO mikroorganizmov [3] [26].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pre kultiváciu

Názov chemikálie	Vzorec	Výrobca
Srvátka	-	Savencia
Kvasničný extrakt	-	HiMedia Laboratories
Dihydrogenfosforečnan draselný P.A.	KH_2PO_4	Lach-Ner, s.r.o
Heptahydrátsíranu meďnatého P.A.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Lach-Ner, s.r.o
Síran amónny P.A.	$(\text{NH})_4\text{SO}_4$	Lach-Ner, s.r.o
Hydrogenfosforečnan draselný P.A.	K_2HPO_4	Lach-Ner, s.r.o
Chlorid sodný P.A.	NaCl	Lach-Ner, s.r.o
Chlorid vápenatý P.A.	CaCl_2	Lach-Ner, s.r.o
Pepton	-	Carl Roth GmbH & Co
D-Glukóza bezvodá P.A.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Lach-Ner, s.r.o
MRS médium	-	BDH Prolabo Chemicals
Octan sodný	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Lach-Ner, s.r.o
Citrát amónny		Lach-Ner, s.r.o
Síran horečnatý bezvodý čistý	MgSO_4	Lach-Ner, s.r.o

4.1.2 Chemikálie použité pre HPLC a GC

Názov chemikálie	Skratka	Výrobca
Kyselina sírová 96 % P.A.	H_2SO_4	Lach-Ner, s.r.o
Chloroform pre HPLC	CHCl_3	Carl Roth GmbH & Co
MiliQ voda	-	VUT
Hexan pre HPLC	C_6H_{14}	Lach-Ner, s.r.o

4.1.3 Ostatné chemikálie

Názov chemikálie	Skratka	Výrobca
Srvátka	-	
Kyselina chlorovodíková 35 % P.A.	HCl	Lach-Ner, s.r.o
Hydroxid sodný perly P.A.	NaOH	Lach-Ner, s.r.o
Síran zinočnatý	ZnSO_4	Lach-Ner, s.r.o
Hexakynožeľeznatán draselný	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Lach-Ner, s.r.o
Etanol pre UV-VIS	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Lach-Ner, s.r.o
Kyselina mliečna 90 %	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	BDH Prolabo Chemicals
Galaktóza D ⁺	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Lach-Ner, s.r.o
Laktóza monohydrát	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	Lach-Ner, s.r.o
Glycerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Lach-Ner, s.r.o
Kyselina octová	CH_3COOH	Lach-Ner, s.r.o
Metanol P.A.	CH_3OH	Lach-Ner, s.r.o
Chloroform	CHCl_3	BDH Prolabo Chemicals
Chlorid horečnatý	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Lach-Ner, s.r.o
Hydroxid draselný	KOH	Lach-Ner, s.r.o

4.2 Prístroje

Kvapalinový chromatograf zostava – UHPLC⁺ focused Dionex UltiMate 3000, Thermo scientific (USA):

PDA detektor Dionex UltiMate 3000, Thermo scientific

RI detektor RefratcoMax 520, ERC

Termostat kolóny LCO 101, Ecom s.r.o

Kolóna – C18 kolóny Rezex ROA-SVBD (300 x 7,8 mm), Phenomenex.

Vyhodnocovací program Chromeleon

Plynový chromatograf Finnigan GC/FID (USA) s kapilárnou kolónou ZB-WAXplus 30 m x 0,32 mm x 0,50 µm

Bioreaktor BioFlo[®]/CelliGen[®] 115 System, New Brunswick[™] (GB)

Vodná kúpeľ Hubert A11

Centrifúga pre mikroskúmavky s chladením 5417R, Eppendorf[®] (USA)

Centrifúga U-32R, Boeco (DE)

Centrifúga Z36HK, Hermle Labortechnik GmbH, (SRN)

Analytické váhy Boeco, odpočítateľnosť 0,1 mg (DE)

Kompaktná váha EK-610i EC, Helago (CZ)

Laminárny box Aura mini- (BioAir), EuroClone (IT)

Trepačka Heidolph unimaax1010, Vitrum (DE)

pH meter, model pH 211, Hanna Instruments (EU)

Vortex Genie[®]2, Scientific industries (USA)

Vortex mixér s univerzálnou hlavou VX-200, Labnet International, Inc. (CZ)

Denzitometer / Detektor optickej hustoty Amersham Biosciences Ultrospec 10 (GB)

UV-Vis Spektrofotometer Helios delta, Thermo Spectronic, (USA)

Sušiareň UF 110, Memmert (DE)

Termoblok, analógový, SBH130, Stuart (UK)

Elektrický varič 2117, ETA (CZ)

Miešadlo s teplotnou doskou H3760-HS, Benchmark Scientific (USA)

4.3 Použité kmene mikroorganizmov

Saccharomyces cerevisiae CNCTC 6651

Saccharomyces cerevisiae CNCTC 6646

Metschnikowia pulcherrima CCY 147

4.4 Metódy a postupy

4.4.1 Lyofilizácia srvátky

Lyofilizácia srvátky prebiehala zo srvátky, ktorá bola obdržaná z výroby syrov po zahutení ultrafiltráciou od firmy Savencia Fromage & Dairy, a. s., Příbyslav, nasledovným postupom. Najprv bol zapnutý lyofilizátor, ktorý sa nechal vychladiť na teplotu $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vychladení bola zapnutá vákuová pumpa, aby sa dosiahlo vákuum v rozmedzí niekoľkých milibarov. Do lyofilizačnej banky objemu 1 L bol naliaty objem 300 ml srvátky, výstupný otvor bol opatrený filtračným papierom proti nečistotám, nádoba bola uzatvorená a vložená do mrazničky v takej polohe, aby sa dosiahol čo najväčší povrch hladiny. Po zamrazení srvátky bola lyofilizačná banka upevnená do lyofilizátora a po dosiahnutí vákua ponechaná lyofilizácií až do úplného odparenia vody.

4.4.2 Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou

Najprv boli pripravené kalibračné štandardy v koncentračnom rozmedzí $30\text{--}300\text{ }\mu\text{g/ml}$ a roztok srvátky o koncentracii $1,502\text{ g/l}$ z lyofilizovanej srvátky. K 1 ml blanku, vzorky a kalibračných štandardov bolo pridané 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Všetky roztoky boli následne inkubované vo vodnom kúpeli pri teplote $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minút. Po ochladení bolo pridané 0,1 ml činidla B, pretrepané a inkubované pri laboratórnej teplote 10 minút. Po 10 minútach sa k všetkým roztokom pridali 3 ml činidla C a premiešali sa s následnou inkubáciou vo vodnom kúpeli pri teplote $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minút. Po ochladení bola u všetkých roztokov štandardov, vzorky a blanku zmeraná absorbanca na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 650 nm oproti blanku. Zo zmeraných hodnôt absorbancie bol výpočtom stanovený obsah proteínov vo vzorke srvátky.

Zloženie pripravených Hartree-Lowryho činidiel:

Činidlo A: 2 g vinan sodno-draselný tetrahydrát, 100 g uhličitan sodný, 500 ml 1 mol/l hydroxid sodný, doplnené na 1 l,

Činidlo B: 2 g vinan sodno-draselný tetrahydrát, 1 g pentahydrát síranu meďnatého, 90 ml voda, 10 ml 1 mol/l hydroxid sodný,

Činidlo C: zriedený 1 objem Folin-Ciocalteu činidla a 15 objemov destilovanej vody.

4.4.3 Stanovenie vlhkosti v lyofilizovanej srvátke

Pre stanovenie obsahu voľnej vody v lyofilizovanej srvátke bolo pomocou analytických váh navážených päť vzoriek o hmotnosti 0,1 g. Presné hmotnosti boli zaznamenané. Vzorky navážené na usušených, vopred zvážených hliníkových miskách boli umiestené do sušiarne vyhriatej na teplotu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a usušené do konštantnej hmotnosti. Po usušení boli misky obsahujúce vzorky prenesené do exsikátora a po vychladení opätovne zvážené na analytických váhach. Z rozdielu hmotnosti bol vypočítaný obsah voľnej vody v lyofilizovanej srvátke.

4.4.4 Elementárna analýza prvkov

Elementárna analýza prvkov CHNS/O prebehla pomocou elementárneho analyzátora Euro-Vector CHNS/O EA 3000 s detektorom TCD. Princíp elementárnej analýzy je spaľovanie vzoriek pri vysokej teplote, rýchle oddelenie výsledných plynných druhov a detekciu TCD. Vzorky srvátky o definovanej hmotnosti (1 mg, presná hmotnosť bola zaznamenaná) byly spálené v kyslíkovej atmosfére pri pracovnej teplote 900 °C. Použitý nosný plyn bol hélium. A celková doba analýzy bol 5 minút. Výsledky analýzy boli vyhodnotené pomocou softwaru Callidus™ v.5.1.

4.4.5 Stanovenie obsahu cukrov pomocou kvapalinovej chromatografie

Stanovenie obsahu cukrov v surovej srvátke, zahustenej ultrafiltráciou, tak ako bola obdržaná od firmy, prebehla pomocou metódy UHPLC na prístroji Thermo scientific s RI detekciou. Analýza prebiehala pri 60 °C s použitím C18 kolóny Rezex ROA-SVBD (300 x 7,8 mm) od firmy Phenomenex. Jednotlivé analyty, cukry, boli eluované pri prietoku 1 ml/ min pri použití mobilnej fáze 5mM H₂SO₄. Celková doba analýzy bola 15 minút a objem nastrekovanej vzorky činil 20 µl. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu Chromeleon.

4.4.6 Deproteinizácia srvátky

Požadované množstvo lyofilizovanej srvátky bolo rozpustené v objeme destilovanej vody tak, aby výsledná koncentrácia srvátky bola 30 g/l. Následne bola srvátka zahrievaná vo vodnom kúpeli o teplote 80 °C po dobu 30 minút. Po ochladení bola vzorka centrifugovaná na 10 000 otáčkach 15 minút. Po centrifugácii bol k supernatantu pridaný Carrezov roztok II, po pridaní vzorka bola centrifugovaná, následne pridaný Carrezov roztok I a centrifugovaná. Každý z Carrezových roztokov bol pridaný v objeme 2,5 % z objemu roztoku vzorky. Po pridaní oboch roztokov bola vzorka opätovne centrifugovaná 15 min. pri 10 000 RPM. Získaný supernatant bol použitý na hydrolýzu laktózy.

Carrezov roztok I: 30 g Hexakynožeľeznatán draselný v 200 ml destilovanej vody

Carrezov roztok II: 60 g síran zinočnatý v 200 ml destilovanej vody

4.4.7 Hydrolýza laktózy obsiahnutej v srvátke

4.4.7.1 Optimalizácia použitého množstva kyseliny chlorovodíkovej pre hydrolýzu laktózy

Optimalizácia hydrolýzy laktózy obsiahnutej v srvátke prebiehala pri konštantnej teplote (90 °C) a reakčnej dobe (60 min), kde meniacou sa premennou bolo množstvo použitej kyseliny chlorovodíkovej, ktorá slúži ako katalyzátor reakcie.

Bol pripravený vodný roztok srvátky navážením potrebného množstva lyofilizovanej srvátky tak, aby výsledná koncentrácia laktózy bola 30 g/l. K roztoku srvátky bola pridaná kyselina chlorovodíková o rôznych koncentráciách. Bolo zvolených dvanásť rôznych koncentrácií, aby výsledná koncentrácia kyseliny chlorovodíkovej bola v rozmedzí 0,002 – 1,632 mol /l. Po pridaní kyseliny chlorovodíkovej bol roztok zahriaty na 90 °C vo vodnom kúpeli a udržiavaný na tejto teplote 1 hodinu. Po ochladení bol roztok srvátky zneutralizovaný na požadované pH

pomocou hydroxidu sodného. Po neutralizácii boli všetky vzorky analyzované pomocou HPLC postupom popísanom v kapitole 4.4.5. Z nameraných chromatogramov bola stanovená percentuálne rozštiepenie laktózy na jej monoméne jednotky.

4.4.7.2 Hydrolyza laktózy v srvátke pre následnú kultiváciu

K roztoku srvátky, ktorého koncentrácia laktózy bola 30 g/l bola pridaná kyselina chlorovodíková, aby výsledná koncentrácia činila 0,933 mol/l. Následne bol roztok zahriaty na 90 °C vo vodnom kúpeli a udržiavaný na tejto teplote 1 hodinu. Po ochladení bol roztok srvátky zneutralizovaný na požadované pH pomocou hydroxidu sodného. Pre kultiváciu kvasiniek bolo pH upravené na hodnotu 5,5 a pre kultiváciu baktérií na 6,4.

4.4.8 Kultivácia mikroorganizmov

Kvasinky a baktérie majú mierne odlišné nároky na výživu a podmienky kultivácie, preto vybrané kmene kvasiniek a baktérií boli kultivované mierne odlišných podmienkach aby sa dosiahol čo najvyšší možný výťažok. Všetky kultivácie prebiehali v dvoch fázach a produkčné a inokulačné média boli sterilizované v tlakovom hrnci po dobu 50 minút.

4.4.8.1 Kultivácia kvasiniek

Vybrané kmene kvasiniek patria medzi mikroorganizmy, ktorých nároky na podmienky kultivácie sú približne zhodné. Kvasinky boli kultivované v tekutých médiách pri 25 °C, a z dôvodu rýchlej sedimentácie buniek prebiehala kultivácia za neustáleho miešania. V prípade kvasiniek rodu *Metschnikowia* kultivácia prebiehala za prístupu vzduchu po celú dobu kultivácie, ktorá trvala 90 hodín. U rodu *Saccharomyces* prebiehala kultivácia 48 hodín, v prípade produkcie etanolu prebiehala kultivácia bez prístupu kyslíka a v prípade produkcie lipidov za prítomnosti kyslíka.

Inokulum

Na počiatku každej kultivácie boli pripravené inokulačné médio objeme 200 ml, ktorých zloženie je v Tabuľka 2 a Tabuľka 3. Kultivácia prebiehala v dvoch stupňoch, na počiatku boli zaočkované inokulá dvoma kľúčkami vybraného kmeňa kvasiniek zo zásobnej Petriho misky. Inokulá boli kultivované 12 hod (*Saccharomyces*) a 12,5 hod (*Metschnikowia*).

Tabuľka 2 Zloženie inokulačného média pre rod *Saccharomyces*

Zložka	Množstvo
Voda	1000 ml
Glukóza	30 g
Peptón	3 g
Kvasničný extrakt	4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
(NH) ₄ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g

Tabuľka 3 Zloženie inokulačného média pre rod *Metschnikowia*

Zložka	Množstvo
Voda	1000 ml
Glukóza	20 g
Peptón	5 g
Kvasničný extrakt	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g

Produkčné média

Druhá fáza kultivácie bola zahájená preočkovaním inokula do produkčných médií, so zachovaním pomeru 1:10. Kultivácia v produkčných médiách mala v prípade *Saccharomyces* dĺžku 48 hodín a u *Metschnikowia* kultivácia prebiehala 90 hodín za rovnakých podmienok ako kultivácia inokúl. Pre kultiváciu bolo zvolených 5 produkčných médií, vždy o inom zložení. Zloženie jednotlivých produkčných médií je uvedené v Tabuľka 4. V prvom prípade prebiehala kultivácia bez prídavku soli (výnimka – glukózové médium), zatiaľ čo v druhom prípade boli ku každému produkčnému médiu pridané soli ako zdroj iónov, ktorých zastúpenie a množstva sú uvedené v Tabuľka 5 a **Tabuľka 6**. Zloženie glukózového produkčného média je zhodné so zložením inokulačného média pre príslušný rod kvasiniek, vid' Tabuľka 2, Tabuľka 3. Typ soli a jeho koncentrácia sa mierne odlišujú pre *Saccharomyces* a pre *Metschnikowia*.

Tabuľka 4 Zloženie a typy produkčných médií použitých pre kultiváciu kvasiniek

Typ produkčného média	Voda (l)	Glukóza (g/l)	Laktóza (g/l)	Galaktóza (g/l)
S	1	0	30	0
G	1	30	0	-
G+S	1	15	15	-
HN	1	približne 15		približne 15
HD	1	približne 15		približne 15

S-srvaťkové médium, bez úpravy; G-glukózové médium; G+S- glukózovo-srvaťkové médium; HN- médium s hydrolyzovanou nedepróteinovanou srvaťkou; HD- médium s depróteinovanou a hydrolyzovanou srvaťkou.

Tabuľka 5 Zloženie produkčných médií so soľami pre kultiváciu rodu *Metschnikowia*

Typ soli	Množstvo (g/l)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0,2
CaCl	0,1
NaCl	0,1

Tabuľka 6 Zloženie produkčných médií so soľami pre kultiváciu rodu *Saccharomyces*

Typ soli	Množstvo (g/l)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
(NH) ₄ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1

4.4.8.2 Kultivácia baktérií

Vybraný kmeň baktérií bol kultivovaný v tekutých médiách pri teplote 37 °C bez miešania. Kultivácia prebiehala v anaeróbných podmienkach v dvoch stupňoch (inokulum a produkčné médium). Kultivácia v produkčných médiách prebiehala po dobu 62 hodín.

Inokulum

Na počiatku každej kultivácie boli pripravené inokulačné média o objeme 200 ml z práškového MRS média, ktorého zloženie je v Tabuľka 7. Kultivácia prebiehala v dvoch stupňoch a teda na počiatku boli zaočkované inokulá dvoma kľučkami zo zásobnej Petriho misky. Inokulá boli kultivované 12 hod.

Tabuľka 7 Zloženie inokulačného média pre rod *Lactobacillus*

Zložka	Množstvo
Voda	1000 ml
Kvasničný extrakt	5 g
Glukóza	20 g
Mäsový extrakt	10 g
Enzymaticky štepený kazeín	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Octan sodný	5 g
Citrát diamonný	2 g
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,05
Polyoxyetylen sorbitan monooleát	1,08

Produkčné média

Druhá fáza kultivácie bola zahájená preočkovaním inokula do produkčných médií, so zachovaním pomeru 1:10. Kultivácia v produkčných médiách prebiehala 62 hodín za podmienok zhodných s podmienkami kultivácie inokúl (37 °C, anaeróbne). Pre kultiváciu bolo zvolených 5 produkčných médií, vždy o inom zložení. Produkčné média boli dvojakého rázu, a to bez prídavku soli a s prídavkom soli ako zdroja iónov. Produkčné média použité pre kultiváciu *Lactobacillus* boli zastúpením cukrov a ich koncentraciami zhodné s produkčnými médiami použitými pre kultiváciu kvasiniek, vid' kapitola 4.4.8.1 Zastúpenie pridaných soli a ich množstva sú uvedené v nasledujúcej tabuľke, Tabuľka 8.

Tabuľka 8 Zloženie produkčných médií so soľami pre kultiváciu rodu *Lactobacillus*

Typ soli	Množstvo (g/l)
Citrát amonný	2
Acetát sodný	5
Bezvodý MgSO ₄	0,20
K ₂ HPO ₄	2

4.4.9 Rastové krivky

Rastové krivky boli stanovené pre všetky použité mikroorganizmy. Pre každý mikroorganizmus bolo pripravené ideálne médium podľa jeho nárokov na výživu (zloženie zhodné so zložením média pre inokulum), a sterilizované v tlakovom hrnci po dobu 50 minút. Následne bolo médium zaočkované 2 kľúčkami zo zásobnej kultúry na Petriho miske. Po zaočkovaní boli odoberané vzorky v pravidelných intervaloch (kvasinky každé 3 hodiny, baktérie každé 2 hodiny). Vždy boli odobrané približne 3 ml, vhodne nariadené a použité na stanovenie nárastu počtu buniek v kultúre pomocou merania OD spektrofotometricky pri 600 nm. Z hodnôt získaných meraním turbidity boli zostrojené rastové krivky pre jednotlivé mikroorganizmy. V 12 hodine boli odobrané vzorky o objeme 40 ml, ktoré bolo použité na štandardizáciu inokula. Časť odobranej vzorky bola vhodne nariadená tak, aby jej t absorbancia bola rovná jedna. Následne bol z tejto vzorky odobraný určitý objem a doplnený, tak aby sa turbidita rovnala 0,8. Rovnakým postupom boli získané roztoky mikroorganizmov s turbiditou 0,6; 0,4 a 0,2. Z takto pripravených roztokov bolo odobraných 5 ml a následne prenesené na usušené, vopred zvážené hliníkové misky, umiestené do sušiarne vyhriatej na teplotu 80 °C a usušené do konštantnej hmotnosti. Po usušení boli misky prenesené do exsikátora a po vychladení zvážené.

4.4.10 Veľkokapacitná kultivácia v bioreaktore

Pre veľkoobjemovú kultiváciu jednotlivých metabolitov bol vybraný kmeň producenta a typ produkčného média, kde bola dosiahnutá najvyššia koncentrácia metabolitu pri kultivácii v Erlenmeyerových bankách, vynímajúc kontrolné glukózové médium. Pre kultiváciu bol zvolený bioreaktor od firmy New Brunswick typ Bio Flo/ CelliGen115 o maximálnom objeme vloženého produkčného média 2 l.

Produkčné médium pre kultiváciu bolo pripravené trojnásobným zriedením surovej srvátky obdržanej od spoločnosti Savencia. V prípade kultivácie *Lactobacillus planatrum* boli pridané

soli v koncentráciách uvedených v kapitole 4.4.8.2 a následne podrobené sterilizácii. Pre kultiváciu kvasiniek bol zriedený roztok srvátky hydrolyzovaný spôsobom popísaným v kapitole 4.4.7.2 a výsledné kultivačné médium sterilizované. Pre rod *Metschnikowia* boli do kultivačného média ešte pridané príslušné soli.

Každá kultivácia vo fermentore prebiehala dvojstupňovou kultiváciou (inokulum a produkčné médium). Čistá fermentačná nádoba bola naplnená produkčným médiom o objeme 1,5 l, vstupné a výstupné otvory fermentora boli uzatvorené a fermentačná nádoba sterilizovaná v autokláve na 120 °C po dobu 15 minút. Po sterilizácii boli zapojené sondy na snímanie teploty a pH, prívod chladiacej kvapaliny a prívod vzduchu a nastavené kultivačné podmienky. V prvom stupni bolo pripravené inokulum o vhodnom objeme a zložení pre daný mikroorganizmus, a ponechané kultivácii príslušný čas, viď kapitoly 4.4.8.1 a 4.4.8.2. Následne pomer zaočkovaného inokula k produkčnému médiu zostal zachovaný, a to 1:10. Inokulum bolo nadávkované do produkčného média pomocou peristaltickej pumpy. Kultivácia v produkčnom médiu prebiehala v závislosti na použítom mikroorganizme (*S.cerevisiae* – 96 hod, *M.andauensis* – 96 hod, *L.plantarum* – 96 hod). V priebehu kultivácie boli v pravidelných intervaloch odoberané vzorky, ktoré boli spracovávané rovnakým spôsobom ako vzorky odoberané pri kultivácii jednotlivých mikroorganizmov v Erlenmeyerových bankách, kapitola 4.4.11. V prípade kultivácie *S.cerevisiae* a *L.plantarum* bolo médium na začiatku kultivácie prebublané dusíkom, aby boli dosiahnuté anaeróbne podmienky kultivácie. Počas celej kultivácie boli nastavené tieto podmienky (Tabuľka 9):

Tabuľka 9 Kultivačné podmienky v bioreaktore

	<i>M. andauensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L.plantarum</i>
pH	5,5	5,5	6,4
Teplota	25 °C	25 °C	37 °C
Prívod vzduchu	0,75 l/min	Bez vzdušnenia	Bez vzdušnenia

4.4.11 Izolácia a stanovenie metabolitov a substrátov

4.4.11.1 Stanovenie sacharidov, kyseliny mliečnej a etanolu metódou HPLC

Stanovenie obsahu sacharidov, kyseliny mliečnej a etanolu v produkčných médiách pred, počas a po skončení kultivácie, prebiehala pomocou metódy HPLC

Pred samotnou analýzou bolo nevyhnutné jednotlivé vzorky najprv centrifugovať pri 7000 RPM po dobu 10 minút a následne prefiltrovať cez 45 µm filter do mikroskúmavky typu Eppendorf. Analýza prebiehala na prístroji Thermo Scientific s PDA a RI detekciou, pri 60 °C s použitím C18 kolóny Rezex ROA-SVBD (300 x 7,8 mm) od firmy Phenomenex. Jednotlivé analyty, cukry, boli eluované pri prietoku 1 ml/ min pri použití mobilnej fázy 5mM H₂SO₄. Celková doba analýzy bola 15 minút a objem nastrekovanej vzorky činil 20 µl. Koncentrácia jednotlivých sacharidov a etanolu bola zaznamenávaná pomocou RI detektoru, zatiaľ čo obsah kyseliny mliečnej bol zaznamenávaný pomocou PDA detektoru pri vlnovej dĺžke 205 nm. Všetky vyššie zmienené analyty bol možné vo vzorke stanoviť súbežne pri jednej analýze. Získané dáta boli vyhodnotené pomocou programu Chromeleon.

4.4.11.2 Izolácia lipidov z kvasiniek

Zmrazená vzorka obsahujúca premytú biomasu z kultivácie v 100 ml Erlenmeyerových bankách/40 ml vzorky z bioreaktoru bola pomaly rozmrazená a centrifugovaná pri 7000 otáčkach po dobu 10 min. Supernatant bol zliaty a z vlhkej tuhej zložky bol navážený 1 g do centrifugačnej kyvety, ktorý bol použitý na extrakciu lipidov. K vlhkej biomase boli pridané 2 ml sklenených guľôčok a 10 ml roztoku $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ v pomere 2:1 (v,v). Pripravená vzorka bola vortexovaná po dobu 30 minút pri najvyšších otáčkach. Po vortexovaní bol pridaný roztok 0,034 % MgCl_2 o objeme 2 ml a vortexovaný 10 minút pri maximálnej rýchlosti. Následne bol roztok centrifugovaný vo vychladenej centrifúge pri 4000 otáčkach po dobu 5 minút. Po centrifugácii bola odstránená vrchná fáza pomocou vákuovej vývevy a odsávacej banky. K zvyšnej organickej fáze boli pridané 4 ml vopred pripraveného roztoku $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ v pomere 48:47:3 (v,v,v) a dôkladne vortexovaná. Vzorka bola opätovne centrifugovaná vo vychladenej centrifúge pri 4000 otáčkach po dobu 5 minút. Následne sa odstránila vrchná fáza rovnakým spôsobom a po odstránení vrchnej fáze bola organická fáza prevedená do sklenenej skúmavky. Ďalším krokom je premytie použitých sklenených guľôčok a získanie prípadných zvyškov lipidov pridaním 4 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ v pomere 2:1 (v,v) a k tomu 2,5 ml $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ v pomere 48:47:3 (v,v,v). Vzorka bola dôkladne vortexovaná s následnou centrifugáciou ako vo vychladenej centrifúge pri 4000 otáčkach, 5 minút. Odstránila sa vrchná fáza použitím vývevy s odsávacou bankou a organická fáza bola opäť odobraná do rovnakej sklenenej skúmavky a umiestnená do termobloku vyhriateho na 80 °C, pokiaľ sa neodparil chloroform. Získané lipidy boli gravimetricky stanovené a analyzované pomocou plynovej chromatografie postupmi popísanými v kapitolách 4.4.11.3 a 4.4.11.4.

4.4.11.3 Gravimetrické stanovenie obsahu celkových lipidov izolovaných z kvasiniek

Pre gravimetrické stanovenie obsahu celkových lipidov v kvasinkách po kultivácii bola najprv usušená sklenená skúmavka a jej hmotnosť bola po usušení zaznamenaná. Následne pri extrakcii lipidov zo vzorky bola organická fáza obsahujúca lipidy prevedená do príslušnej zvaženej sklenenej skúmavky. Sklenená skúmavka obsahujúca extrakt lipidov bola následne uložená do termobloku vytemperovaného na teplotu 80 °C, kde bola ponechaná do úplného odparenia chloroformového rozpúšťadla. Po odparení bola vzorka presunutá do exsikátora a po vychladnutí zvážená na analytických váhach. Z rozdielu hmotnosti bola vypočítaná hmotnosť extrahovaných lipidov.

4.4.11.4 Transesterifikácia lipidov

Vysušená vzorka lipidov po extrakcii bola rozpustená v 2 ml chloroformu HPLC kvality. Do sklenenej vialky bolo napipetovaných 4,5 ml hexanu HPLC kvality a pridaných 500 μl chloroformového vzorku obsahujúceho lipidy. Zmes bola doplnená 500 μl 2 M KOH v metanole a intenzívne pretrepávaná 8 minút. Po 8 minútach bola zmes ponechaná 6 minút stáť, pokiaľ nedošlo k rozdeleniu jednotlivých fáz. Pre analýzu metylesterov mastných kyselín bol odobraný 1 ml hornej fázy a prevedený do malých sklenených vialiek s uzáverom so septom.

4.4.11.5 Analýza lipidov

Pre analýzu metylom esterifikovaných bunkových lipidov bol použitý plynový chromatograf Finnigan GC (USA). Bola použitá kapilárna kolóna ZB-WAXplus s rozmermi 30 m x 0,32 mm x 0,50 μ m. Celková doba analýzy bola 55 minút pri prietoku nosného plynu 1 ml/min a použitý nosný plyn bol dusík. Pre analýzu bol použitý plameňovo ionizačný detektor. Podmienky GC analýzy boli nasledovné:

- Teplotná rampa: 60 stupňov po dobu 5 minút.
 1. rampa 12 stupňov za minútu do 200 stupňov s výdržou 10 minút
 2. rampa 5 stupňov za minútu do 220 stupňov s výdržou 15 minút
 3. rampa 10 stupňov za minútu do 240 stupňov s výdržou 2 minút
- FID detektor - teplota 275 stupňov. prietok plynu je 350 ml/min vzduchu, 35 ml/min vodíka a 30ml/min dusíka
- Rozpúšťadlo je hexán GC kvality.

Získané dáta boli vyhodnotené pomocou programu Xcalibur a MS Excel.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Charakteristika srvátky

Charakterizácia srvátky je dôležitým prvým krokom. Je nevyhnutné stanoviť zloženie z hľadiska porovnania so zložením uvádzaným v publikovaných vedeckých článkoch a najmä z aspektu jej správneho spracovania pre potreby kultivácie a hodnotenia získaných výsledkov.

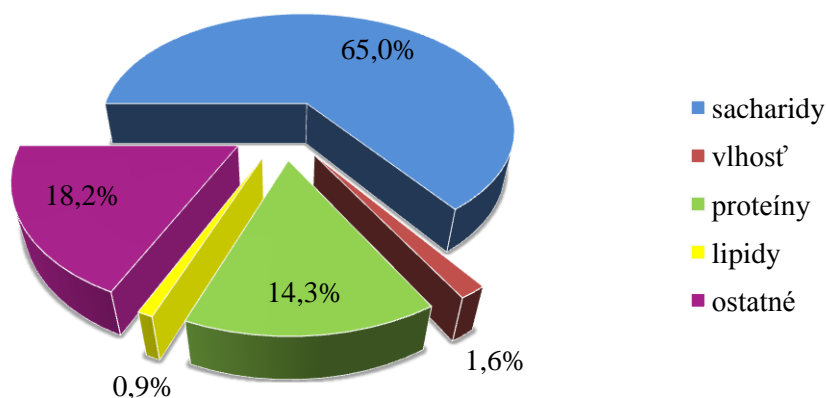
5.1.1 Obsahové zloženie srvátky

Pri analýze percentuálneho zastúpenia zložiek srvátky sa postupovalo postupmi popísanými v kapitolách 4.4.2, 4.4.3, 4.4.5, 4.4.11.2. Všetky analýzy prebiehali z vopred lyofilizovanej srvátky podľa postupu popísaného v kapitole 4.4.1.

Tabuľka 10 Obsahové zloženie lyofilizovanej srvátky

Zložka	Percentuálne zastúpenie
Sacharidy	64,97 %
Vlhkosť (voda)	1,63 %
Proteíny	14,32 %
Lipidy	0,90 %
Ostatné	18,18 %

Obsahové zloženie srvátky



Obrázok 13 Percentuálne obsahové zloženie lyofilizovanej srvátky

Z grafu na Obrázok 13 je zrejmé, že najväčší percentuálny podiel pripadá celkovým sacharidom (z toho 98,22 % je laktóza). Viac ako štrnásťpercentné zastúpenie v sušenej srvátke majú proteíny, ktoré zostali rozpustené po zrážaní mlieka či už enzýmaticky alebo okyslením mlieka. Okrem proteínov sa v srvátke nachádza aj minorný podiel lipidov (1 %). Zostávajúci podiel, ktorý v predloženej diplomovej práci nebol stanovený, tvoria z prevažnej väčšiny dusíkaté látky nebielkovinovej povahy, minerálne látky, vitamíny, kyseliny, a minerály [4]. Stanovené zloženie lyofilizovanej srvátky je porovnateľné so zložením

nachádzajúcim sa v početných štúdiách, napríklad Suková alebo Panesar a kolektív [4] [5]. Je však nevyhnutné poznamenať, že zloženie srvátky mnohokrát kolíše, a to najmä v závislosti na použitom mlieku a metóde spracovania [4].

Okrem percentuálneho zloženia lyofilizovanej srvátky bolo stanovené, že neupravovaná srvátka, zahustená reverznou osmózou obsahuje 123,1 g/l laktózy. Výsledky boli získané pomocou metódy HPLC na prístroji Thermo Scientific s RI detekciou a postupom popísaným v kapitole 4.4.5.

5.1.2 Elementárna analýza

Tabuľka 11 Výsledky elementárnej analýzy lyofilizovanej srvátky

Vzorka	N	C	H	O
1	2,717	39,804	7,353	-
2	2,647	39,031	7,290	-
3	2,168	40,206	7,438	-
Priemer	2,511	39,680	7,360	-

Z výsledkov elementárnej analýzy je zreteľné, že najvyšší podiel zloženia lyofilizovanej srvátky utvára uhlík. Túto skutočnosť je možné pripisovať pomerne hojnému zastúpeniu organických látok, ako sú sacharidy, proteíny a tiež lipidy (viď kapitola 5.1.1), ktorých základnú kostru molekuly tvorí uhlík. Druhým najviac zastúpeným prvkom stanovovaným v elementárnej analýze bol vodík, ktorý je taktiež prítomný vo všetkých organických molekulách bez výnimky. Takmer trojpercentné zastúpenie dusíka je spôsobené najmä prítomnosťou proteínov (viac ako 14 %) a minoritne, ako je spomenuté v literatúre, tiež dusíkatými látkami nebielkovinnej povahy [4].

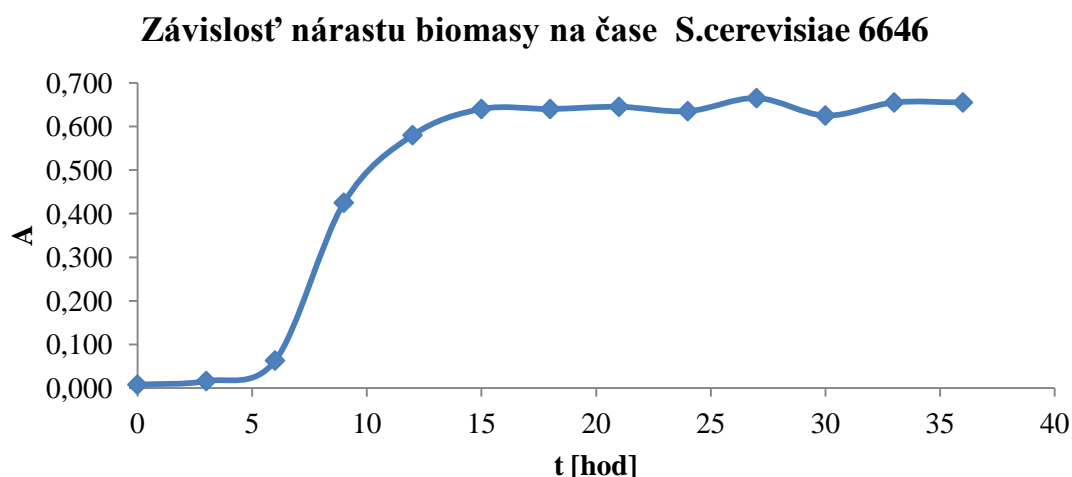
5.2 Rastové charakteristiky

Stanovenie rastových charakteristík je nesmierne dôležitým krokom pre pochopenie fyziológie vybraných mikroorganizmov a taktiež pre zaistenie čo najvyššej produkcie vybraných metabolitov. Rastová charakteristika je vyjadrená ako závislosť nárastu biomasy v čase a bola stanovená podľa postupu popísaného v kapitole 4.4.9. Rasové charakteristiky boli stanovené pre všetky mikroorganizmy použité v predloženej diplomovej práci - teda *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6651 a *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646, *Metschnikowia andauensis* CCY 129, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 147, *Lactobacillus plantarum* CNCTC 6447. Tabuľky obsahujúce namerané hodnoty OD v závislosti na čase, pre všetky študované kmene kvasníc a baktérií sú uvedené prílohe v Prílohe 1 (Tabuľky 1A-1E).

5.2.1 Kalibračná závislosť hodnoty absorbancie na množstve biomasy

5.2.1.1 Rastová charakteristika *Saccharomyces cerevisiae* 6646

Získané hodnoty priebehu rastu *Saccharomyces cerevisiae* 6646, ktoré boli obdžané kultiváciou postupmi popísanými v kapitole 4.4.9, sú znázornené v grafe, viď Obrázok 14.

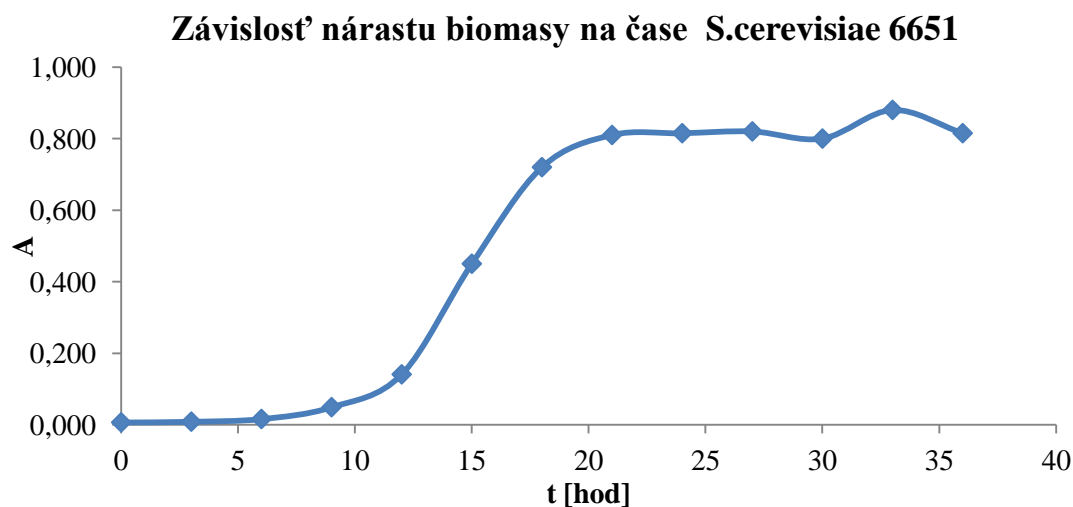


Obrázok 14 Graf rastovej charakteristiky *Saccharomyces cerevisiae* 6646

Z grafu (Obrázok 14) je veľmi jasne pozorovateľne, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* 6646 sa do piatej hodiny od začatia kultivácie nachádza v lag fáze, čo znamená že sa po prenesení do tekutého média prispôsobuje a teda nepodlieha rýchlemu rozmnožovaniu. V okolí šiestej hodiny sa kvasinka dostáva do krátkej fáze zrýchleného rastu následne do exponenciálnej fáze, kedy sa bunky delia najvyššou rýchlosťou. Pri zavŕšení dvanástej hodiny kultivácie sa krivka rastovej charakteristiky pomaly vyrovnáva do vodorovnej polohy, čo naznačuje pomalý príchod fáze spomaleného rastu a stacionárnej fáze. Rastová charakteristika *S.cerevisiae* 6646 má klasický esovitý tvar popísaný v literatúre [17] [23].

5.2.1.2 Rastová charakteristika *Saccharomyces cerevisiae* 6651

Hodnoty priebehu rastu *Saccharomyces cerevisiae* 6651, ktoré boli získané kultiváciou postupmi popísanými v kapitole 4.4.9, sú znázornené na Obrázok 15.



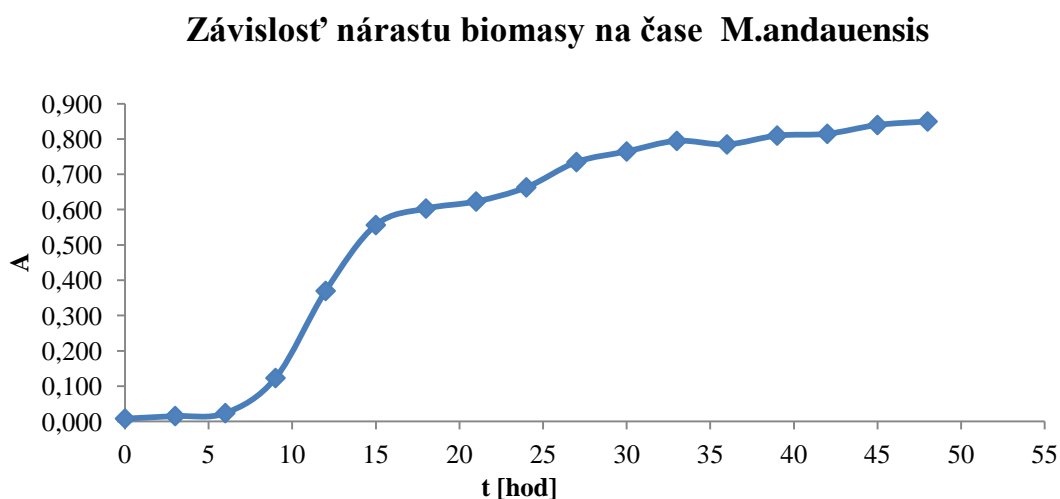
Obrázok 15 Graf rastovej charakteristiky *Saccharomyces cerevisiae* 6651

Podobne ako u predchádzajúceho kmeňa kvasiniek aj *S.cerevisiae* 6651 vykazuje typický esovitý tvar rastovej krivky. Rast kultúry v prípade *S.cerevisiae* 6651 v porovnaní s predchádzajúcim kmeňom vykazuje pomalší charakter. Lag fáza pretrváva približne rovnakú dobu 5-6 hod, nasledovaná je zrýchlenou fázou rastu, ktorá pozvoľnejšie prechádza do exponenciálnej fázy. Krivka exponenciálnej fázy rastu je zreteľne menej strmá ako to bolo v prípade *S.cerevisiae* 6646, čo naznačuje pomalšie rozmnožovanie a metabolizmus. Do stacionárnej fázy sa kultúra dostáva až za 20-21 hod.

Na základe zmeraných rastových charakteristík pre kvasinkové kmene *S.cerevisiae* 6646 a *S.cerevisiae* 6651 bolo rozhodnuté, že najlepším časom na presun kultivácie do produkčných médií je dvanásť hodín kultivácie v inokulačnom médiu príslušného kmeňa kvasinky.

5.2.1.3 Rastová charakteristika *Metschnikowia andauensis*

Výsledky sledovania rastu kultúry kvasinky *Metschnikowia andauensis*, boli obdržané postupom opísaným v kapitole 4.4.9 a namerané hodnoty sú uvedené v a znázornené na Obrázok 16.



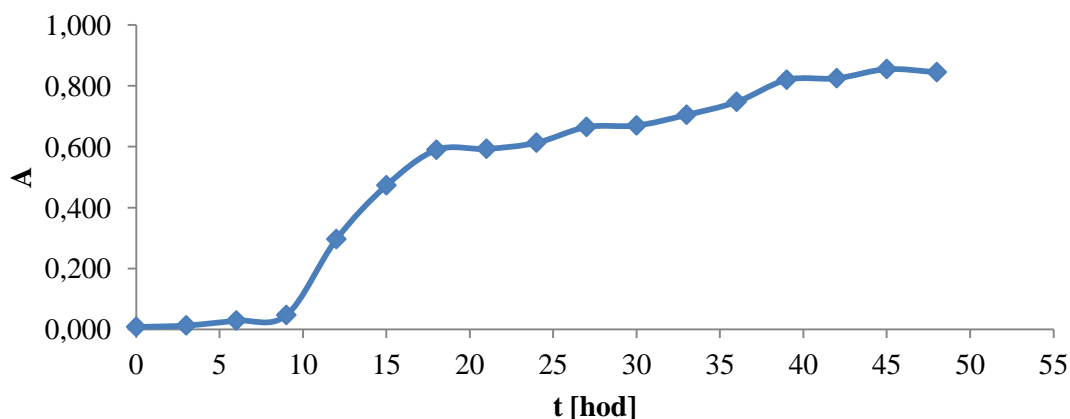
Obrázok 16 Graf rastovej charakteristiky pre *M. andauensis*

Rastová charakteristika uvedenej kvasinky *M. andauensis* má priebeh rastovej krivky podobný rastovým krivkám kvasiniek rodu *Sachcaromyces*. Do obdobia šiestej hodiny pretrváva lag fáza nasledovaná exponenciálnou fázou, ktorá dosahuje svojho konca v období pätnástej hodiny a plynule prechádza do fázy spomaleného rastu, kedy prírastok biomasy v čase je podstatne nižší oproti fáze exponenciálnej. Exponenciálna fáza je najvhodnejším obdobím na prenos buniek vybranej kultúry do nového média, a preto pre zahájenia kultivácie v zvolených produkčných médiách boli odobrané bunky kvasiniek prenesené do produkčných médií v 12 hodine a 30 minútach kultivácie inokulačného média.

5.2.1.4 Rastová charakteristika *Metschnikowia pulcherrima*

Výsledky pozorovania rastu kultúry kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*, boli obdržané postupom opísaným v kapitole 4.4.9 a namerané hodnoty sú uvedené v a znázornené na Obrázok 17.

Závislosť nárastu biomasy na čase *M.pulcherrima*



Obrázok 17 Graf rastovej charakteristiky pre *M. pulcherrima*

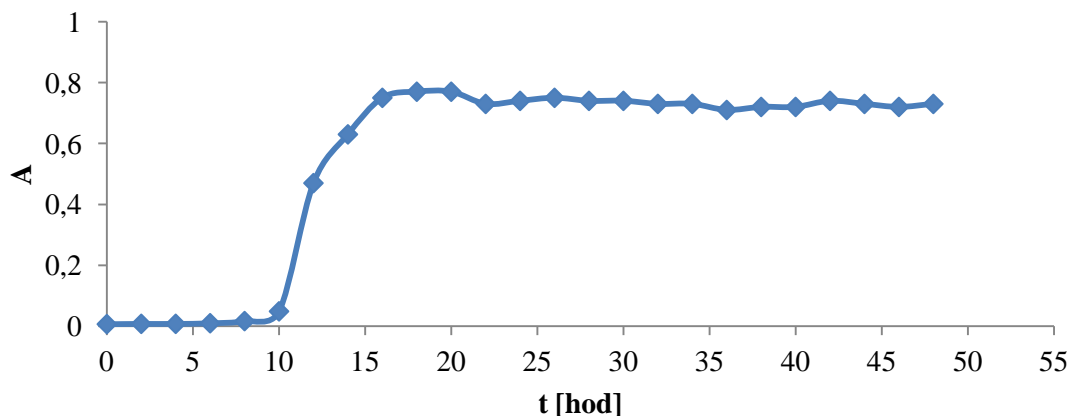
Rastová charakteristika uvedenej kvasinky má zo všetkých kvasiniek študovaných v predloženej diplomovej práci najdlhšiu lag fázu a do exponenciálnej fázy rastu sa dostáva až v časovom úseku od desiatej hodiny až po osemnástu hodinu kultivácie. Po osemnásťhodine kultivácie prechádza exponenciálna fáza rastu plynule do fázy spomaleného rastu, kedy dochádza k poklesu metabolickej aktivity a taktiež k poklesu rýchlosti rozmnožovania kvasiniek, no neustále dochádza k miernemu nárastu biomasy v čase.

Z predloženého grafu bolo usúdené, že najvhodnejšia doba na preočkovanie/prenesenie kultúry do nového čerstvého média je v okolí 12. hodiny. Pre potreby začatia kultivácie na vybraných produkčných médiách boli použité bunky kultivované v inokule 12 hodín 30 minút.

5.2.1.5 Rastová charakteristika *Lactobacillus plantarum*

Výsledky pozorovania rastu kultúry kvasinky *Lactobacillus plantarum*, boli obdržané postupom opísaným v kapitole 4.4.9 a dosiahnuté výsledky sú znázornené na Obrázok 18.

Závislosť nárastu biomasy na čase *L.plantarum*



Obrázok 18 Graf rastovej charakteristiky pre baktérie *Lactobacillus plantarum*

Rastová krivka získaná zostrojením grafu ako závislosti optickej hustoty na čase vykazuje klasický esovitý charakter s veľmi strmou exponenciálnou fázou rastu trvajúcou od desiatej do približne štrnásť hodiny. V okolí šestnásť hodine dochádza k zníženiu multiplikačnej rýchlosti, čo naznačuje vstup do krátkej fáze spomaleného rastu a nasledovanej stacionárnou fázou.

Na základe experimentálne získanej rastovej charakteristiky *L.plantarum* boli pre potreby kultivácie v zvolených produkčných médiách odobrané bunky baktérií a prenesené do produkčných médií v dvanásť hodine kultivácie inokulačného média.

5.3 Hydrolýza laktózy obsiahnutej v srvátke

5.3.1 Optimalizácia množstva kyseliny chlorovodíkovej

Optimalizácia množstva použitej srvátky prebehla podľa postupu popísaného v kapitole 4.4.7.1. Z výsledkov bola zostrojená tabuľka, ktorá vyjadruje, z koľkých percent došlo k premene pôvodnej laktózy na jednotlivé monosacharidy a celkovú percentuálne rozštiepenie laktózy.

Tabuľka 12 Percentuálne vyjadrenie rozštiepenia laktózy na monoméne jednotky prídavkom rôznych koncentrácií kyseliny chlorovodíkovej a následnej hydrolýze pri 90 °C, 60 minút

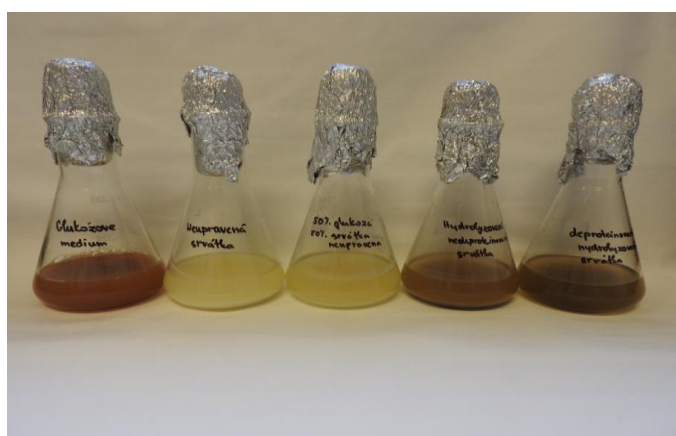
C _{kys. HCl} [mol/l]	Glukóza (%)	Galaktóza (%)	Premena celkom (%)
Blank	1,46	1,57	3,04
0,002	1,72	1,81	3,53
0,010	2,00	2,02	4,01
0,020	2,59	2,77	5,36
0,167	2,35	2,43	4,78
0,333	2,21	2,38	4,59
0,500	4,67	4,79	9,46
0,601	33,13	36,94	70,07
0,714	51,45	42,72	94,17
0,933	51,09	43,49	94,58
1,142	41,60	50,93	92,53
1,632	43,26	48,96	92,22

Z nameraných hodnôt obsiahnutých v Tabuľka 12 je viditeľné, že k účinnej hydrolýze laktózy obsiahnutej v srvátke dochádzalo až pri koncentráciách kyseliny chlorovodíkovej nad 0,600 mol/l a k takmer úplnému rozštiepeniu u koncentrácií 0,714 mol/l. Na základe výsledkov analýzy z HPLC a vizuálneho hodnotenia roztoku bolo konštatované, že najvýhodnejšia koncentrácia kyseliny chlorovodíkovej je 0,933 mol/l. Pri vyšších koncentráciách kyseliny chlorovodíkovej už intenzívne prebiehali Maillardové hnednúce reakcie a roztok srvátky sa sfarbil do tmavohneda.

Stanovená koncentrácia kyseliny chlorovodíkovej bola použitá pri všetkých hydrolýzach roztoku srvátky pre prípravu hydrolyzovaných produkčných médií s obsahom srvátky.

5.4 Vplyv prítomnosti soli na produkciu vybraného metabolitu na rôznych produkčných médiách

V záujme dosiahnutia čo najvyššieho možného výťažku metabolitov, boli jednotlivé kmene kvasiniek a baktérií podrobené kultivácií vo vybraných srvátkových médiách vždy dvakrát. Prvýkrát bola kultivácia prevedená bez prídavku charakteristických soli pre daný rod mikroorganizmu a druhýkrát s prídavkom soli ku každému srvátkovému médiu (zloženie jednotlivých médií a metódy práce sú uvedené v kapitole 4.4.8. Následne bola porovnaná výťažnosť požadovaného metabolitu a spotreby sacharidov. Jednotlivé kultivačné banky s príslušnými srvátkovými médiami a kontrolným glukózovým médiom sú na Obrázok 19.



Obrázok 19 Jednotlivé kultivačné média po kultivácii. Zľava doprava: glukózové médium, neupravená srvátka, 50% glukózy-50% srvátka nedepróteinovaná, hydrolyzovaná nedepróteinovaná srvátka, depróteinovaná hydrolyzovaná srvátka,

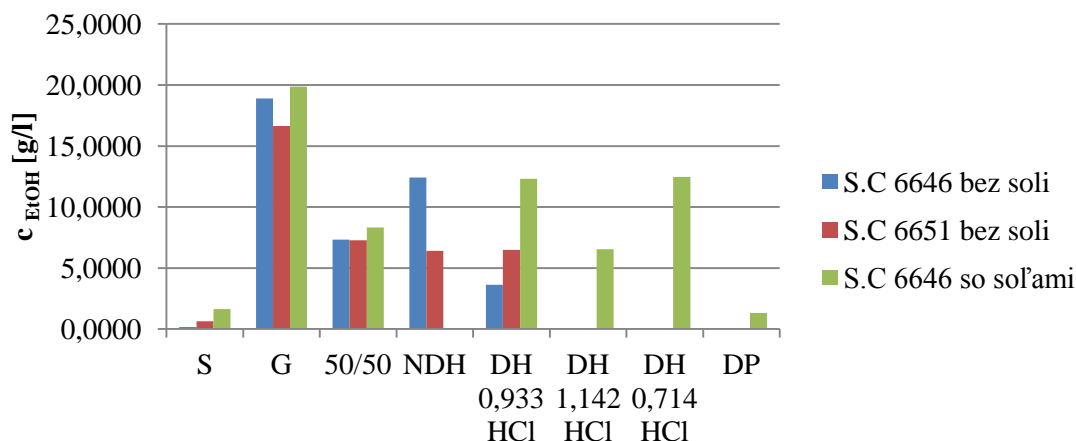
Používané skratky médií:

- S – neupravená srvátka;
- G – kontrolné glukózové médium;
- 50/50 – 15 g/l glukózy/15 g/l laktózy v srvátke;
- NDH – nedepróteinovaná hydrolyzovaná srvátka;
- DH – depróteinovaná hydrolyzovaná srvátka;
- DP – depróteinovaná srvátka

5.4.1 Kultivácia kvasiniek rodu *Saccharomyces cerevisiae* za účelom produkcie etanolu

Kultivácia kvasiniek rodu *Saccharomyces* prebiehala za podmienok a postupmi popísanými v kapitole 4.4.8.1 Vzorky na analýzu zvyškových sacharidov a požadovaného produktu etanolu boli odoberané v čase 0 hodín a následne na konci kultivácie v čase 48 hodín. Získané vzorky pre stanovenie sacharidov a etanolu boli upravené postupom popísaným v kapitole 4.4.11.1. Výsledky analýz boli následne spracované a vynesené do grafov.

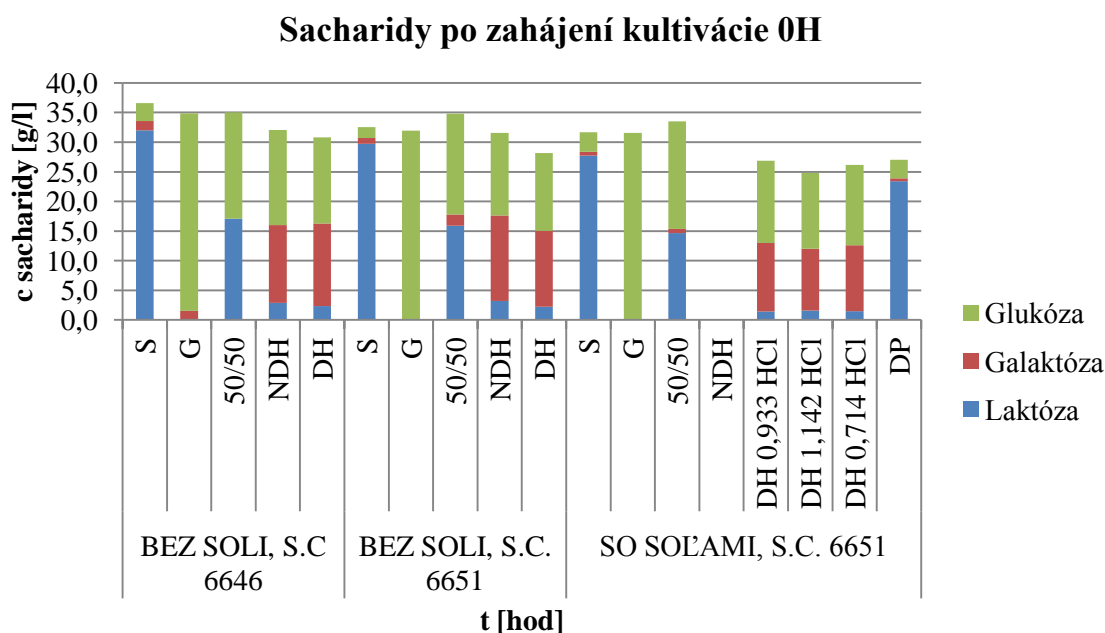
Saccharomyces cerevisiae koncentrácia etanolu v čase 48 hod



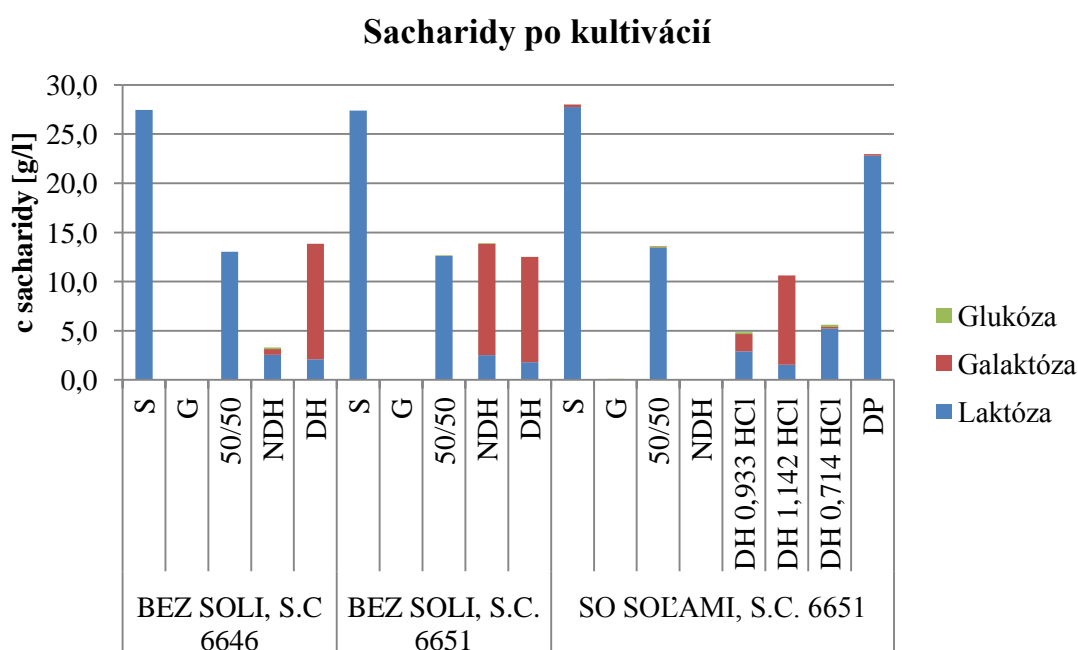
Obrázok 20 Graf koncentrácie etanolu v závislosti na použítom produkčnom médiu u vybraného kmeňa kvasinky *Saccharomyces*. S – neupravená srvátka; G – kontrolné glukózové médium; 50/50 – 15 g/l glukózy/15 g/l laktózy v srvátke; NDH – nedepteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DH – depteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DP – depteinovaná srvátka

Z grafu vedeného na Obrázok 20 je zreteľné, že prídavok soli nemal žiaden pozitívny účinok na tvorbu etanolu, pretože produkcia etanolu u kvasinky *S.cerevisiae* 6646 dosahuje na oboch médiách veľmi porovnateľné koncentrácie etanolu. To poukazuje na to, že kvasinky rodu *Saccharomyces* nemajú vysoké nároky na kultivačné prostredie a bohato si vystačia aj s látkami prítomnými v srvátke. Najvyšších produkcií dosahujú kvasinky na *S.cerevisiae* 6646 na hydrolyzovaných srvátkových médiách bez ohľadu na to, či bola srvátka depteinovaná alebo nebola. Koncentrácia etanolu na konci kultivácie pre *S.cerevisiae* 6646 na oboch médiách je takmer 12,5 g/l. Rozdiel vo výťažku etanolu pri kultivácii je u kvasinky *S.cerevisiae* 6651, ktorej výťažky etanolu na jednotlivých médiách sú nižšie.

Na Obrázok 21 a Obrázok 22 je znázornené sacharidické zastúpenie v jednotlivých produkčných médiách počiatku kultivácie v čase 0 hodín a po jej ukončení v čase 48 hodín, spolu s glukózovou kontrolou. Hoci na počiatku kultivácie bolo koncentračné zastúpenie galaktózy v hydrolyzovaných srvátkových médiách približne rovnaké, na konci kultivácie sú pozorovateľné rozdiely. Zatiaľ čo, kvasinka *S.cerevisiae* 6646 skvasila takmer všetku galaktózu a glukózu v produkčnom médiu s nedepteinovanou hydrolyzovanou srvátkou, v prípade depteinovanej hydrolyzovanej srvátky nedošlo k skvasovaniu galaktózy. V prípade *S.cerevisiae* 6651 nedošlo k skvasovaniu galaktózy ani v jednom spomínanom prípade. To poukazuje nehostinné prostredie, čo dokazuje aj rozdiel koncentrácia etanolu pre depteinovanú srvátku s prídavkom a bez prídavku soli.



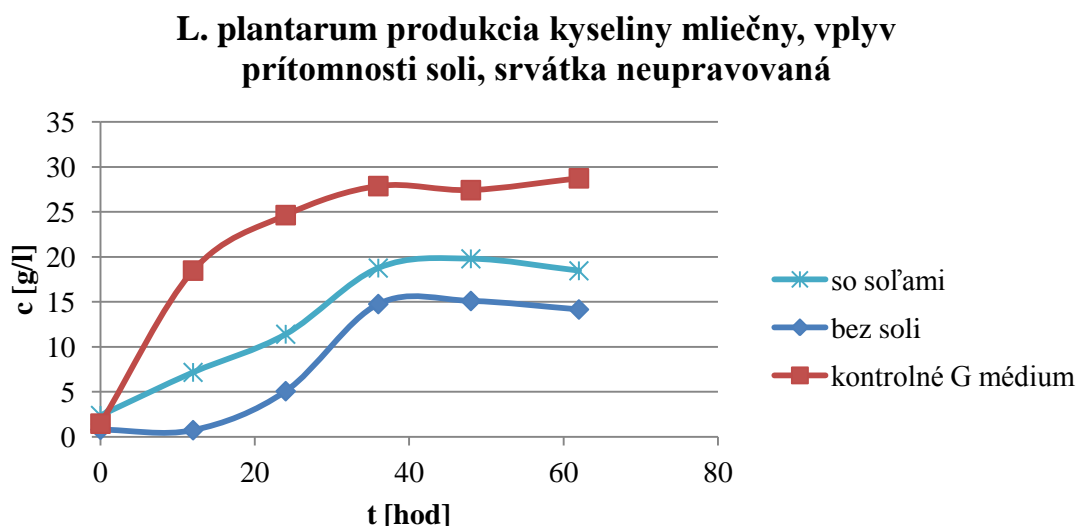
Obrázok 21 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod kultivácie v každom produkčom médiu. S – neupravovaná srvátka; G – kontrolné glukózové médium; 50/50 – 15 g/l glukózy/15 g/l laktózy v srvátke; NDH – nedeproteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DH – deproteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DP – deproteinovaná srvátka



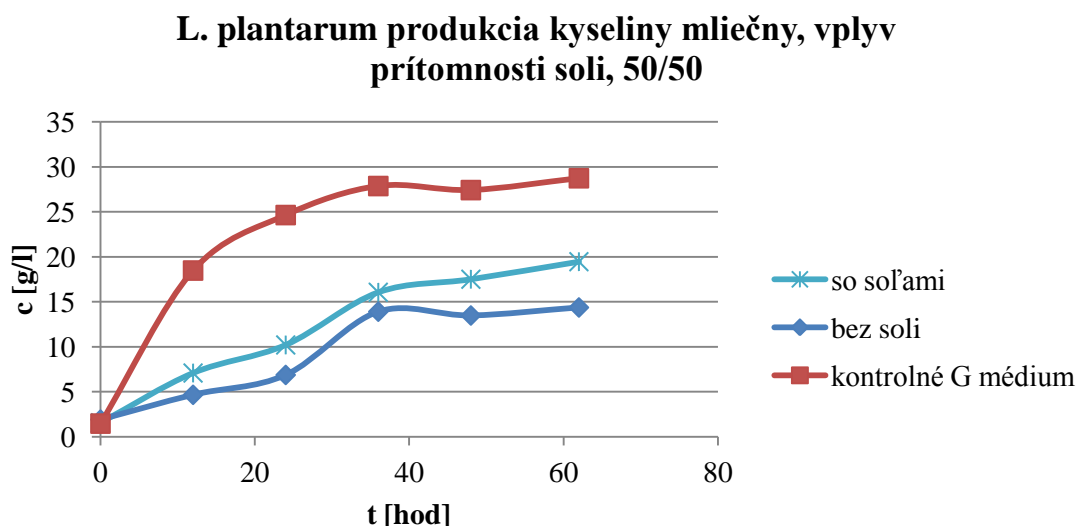
Obrázok 22 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 48 hod kultivácie v každom produkčom médiu. S – neupravovaná srvátka; G – kontrolné glukózové médium; 50/50 – 15 g/l glukózy/15 g/l laktózy v srvátke; NDH – nedeproteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DH – deproteinovaná hydrolyzovaná srvátka; DP – deproteinovaná srvátka

5.4.2 Kultivácia *Lactobacillus planatarum* za účelom produkcie kyseliny mliečnej

Kultivácia baktérií druhu *Lactobacillus planatarum* prebiehala za podmienok a postupmi popísanými v kapitole 4.4.8.2. Vzorky boli odoberané v pravidelných intervaloch, a to v čase 0, 12, 24, 36, 48 a 62 hodine. Získané vzorky boli analyzované pomocou HPLC za podmienok popísaných v kapitole 4.4.11.1 a výsledky boli vynesené do grafov (Obrázok 24 – Obrázok 27).

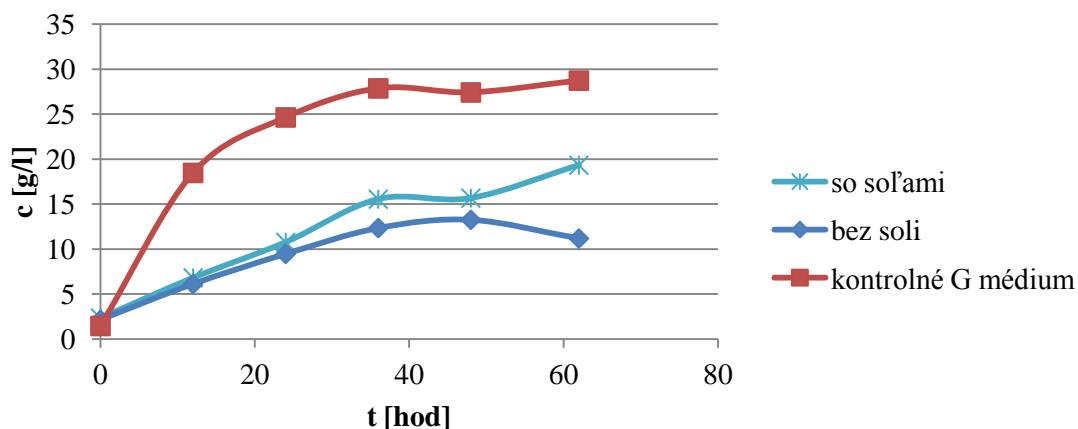


Obrázok 23 Produkcia kyseliny mliečny baktériami *L. plantarum*, a vplyv prítomnosti soli na jej výťažok, srvátka neupravovaná



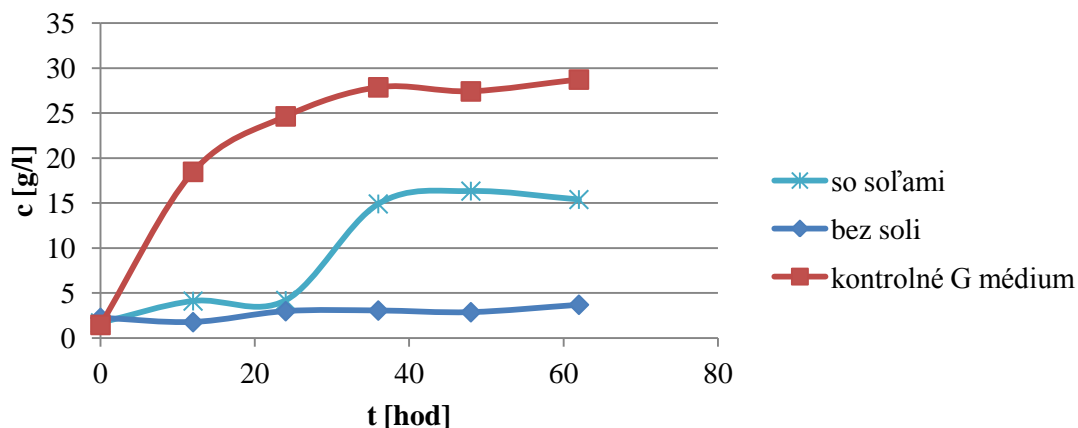
Obrázok 24 Produkcia kyseliny mliečny baktériami *L. plantarum*, a vplyv prítomnosti soli na jej výťažok, 50% glukóza-50% laktóza v srvátke

L. plantarum produkcia kyseliny mliečnej, vplyv prítomnosti soli, NDH



Obrázok 25 Produkcia kyseliny mliečnej baktériami *L. plantarum*, a vplyv prítomnosti soli na jej výťažok, srvátka nedeproteinovaná hydrolyzovaná

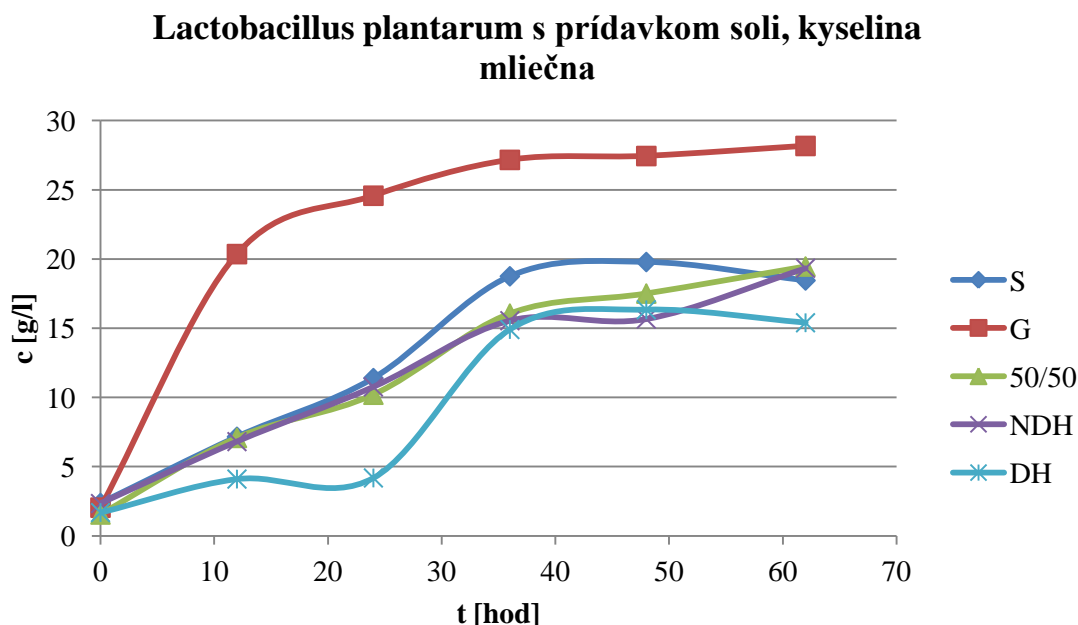
L. plantarum produkcia kyseliny mliečnej, vplyv prítomnosti soli, DH



Obrázok 26 Produkcia kyseliny mliečnej baktériami *L. plantarum*, a vplyv prítomnosti soli na jej výťažok, srvátka deproteinovaná hydrolyzovaná

Z grafov vedených vyššie (Obrázok 23 – Obrázok 26) je zreteľné, že prídavok soli mal výrazne pozitívny účinok na tvorbu kyseliny mliečnej. Táto skutočnosť poukazuje na to, že baktérie druhu *L. plantarum* vyžadujú pre svoj rast a metabolizmus komplexnejšie kultivačné médium, to znamená, že prítomnosť vybraných soli výrazne podporuje ich rast a metabolizmus. V každej modifikácii srvátkového produkčného média je zreteľne nižšia produkcia kyseliny mliečnej v porovnaní s kontrolným glukózovým médiom. Podľa experimentálne zisteného obsahového zloženia srvátky, kde 18 % tvorili látky

neidentifikované, v literatúre popísané ako dusíkaté látky nebielkovinovej povahy, minerálne látky, vitamíny, kyseliny, a minerály, je možné usudzovať, že v srvátkových produkčných médiách sa nachádzali látky, ktoré mohli negatívne ovplyvňovať metabolizmus baktérií. Pre lepšie porovnanie priebehu produkcie kyseliny mliečnej v jednotlivých srvátkových médiách s prídavkom soli, bol zostrojený sumárny graf, vid'. Obrázok 27.

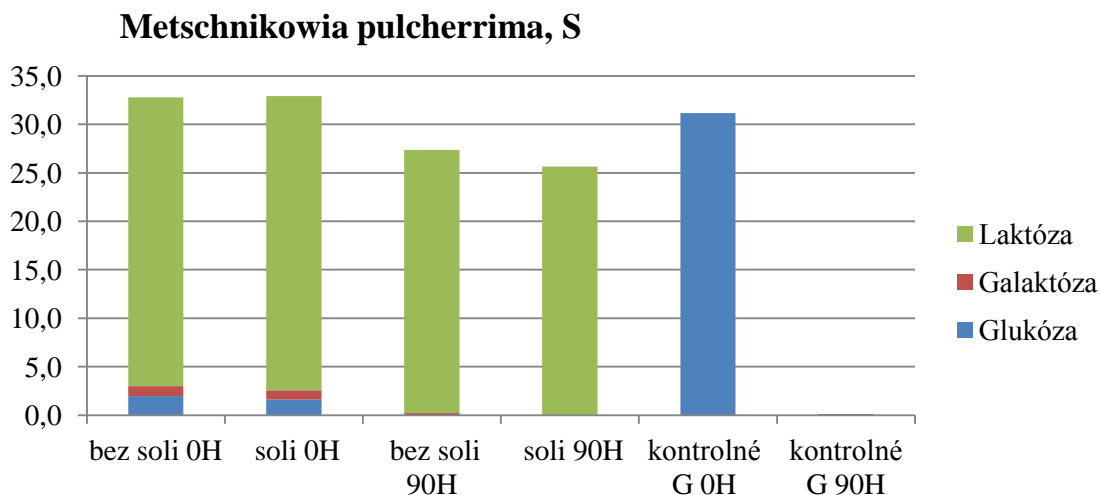


Obrázok 27 Produkcia kyseliny mliečnej baktériami *L.plantarum*, porovnanie produkcie kyseliny mliečnej v čase kultivácie pre produkčné média s obsahom srvátky a prídavkom soli

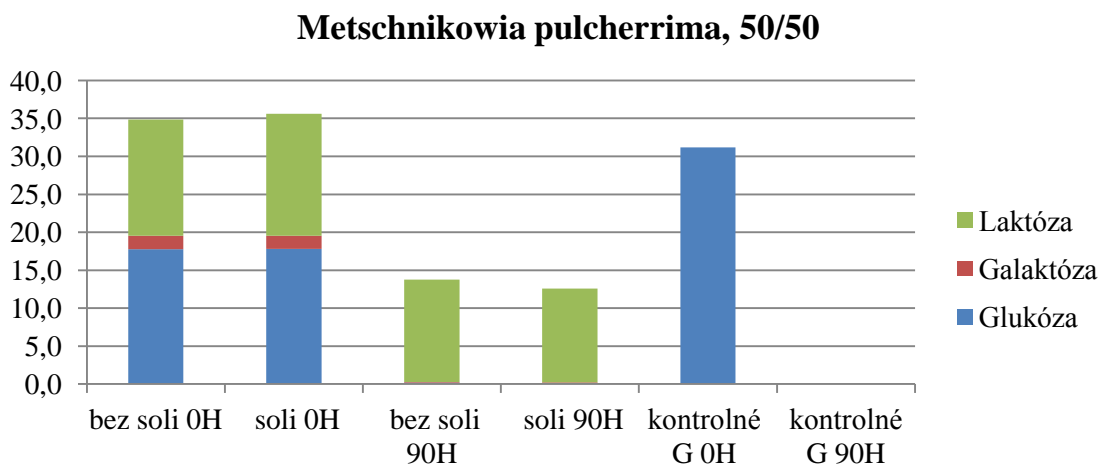
Zo sumárneho grafu produkcie kyseliny mliečnej na rôznych srvátkových médiách je možné usudzovať, že hydrolýza laktózy obsiahnutej v srvátke nemá pozitívny vplyv na urýchlenie využitia sacharidov a produkciu kyseliny mliečnej. Konečné koncentrácie kyseliny mliečnej sú takmer identické a teda je najvýhodnejšie použitie neupravovanej srvátky s prídavkom soli. Overenie tohto tvrdenia bolo vykonané kultiváciou v bioreaktore práve na neupravovanej srvátke s prídavkom soli.

5.4.3 Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia* za účelom produkcie lipidov

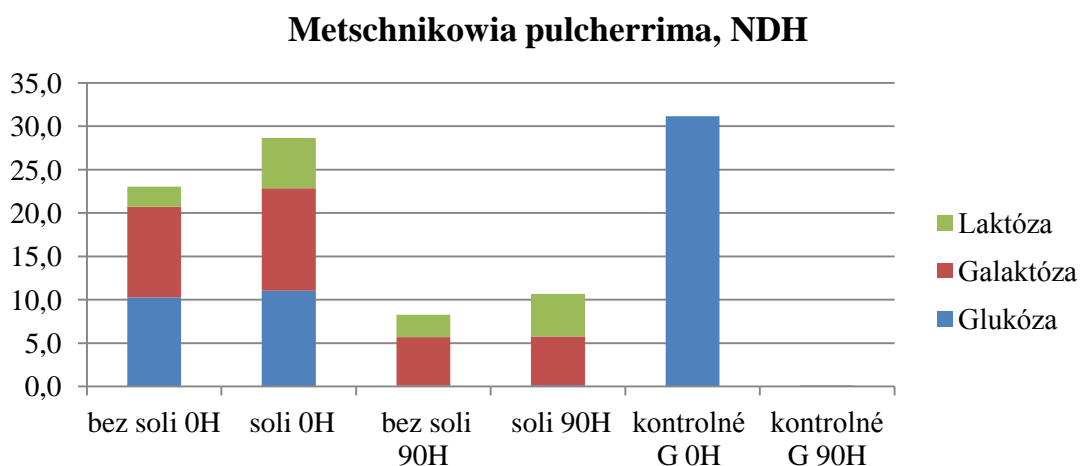
Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia* prebiehala za podmienok a postupmi popísanými v kapitole 4.4.8.1. Vzorky boli odoberané v čase 0 a následne na konci kultivácie v čase 90 hodín. Získané vzorky pre stanovenie cukrov boli upravené postupom popísaným v kapitole 4.4.11.1 a biomasa bola podrobená izolácií, gravimetrickej analýze, trans-esterifikácií nasledovanej plynovou chromatografiou. Popisy spomenutých metód a postupov sú zapísané v kapitolách 4.4.11.2, 4.4.11.3, 4.4.11.4, 4.4.11.5. Výsledky boli spracované a vynesené do grafov.



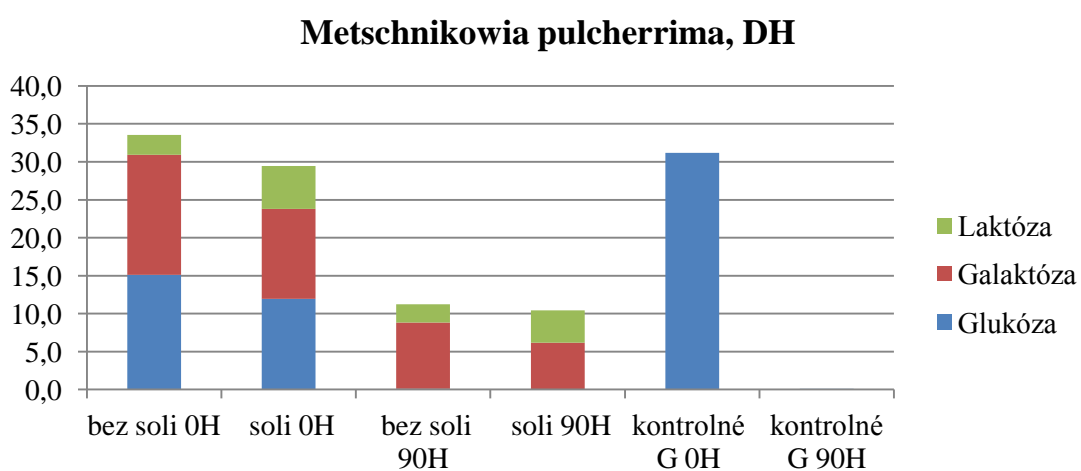
Obrázok 28 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce neupravenú srvátku



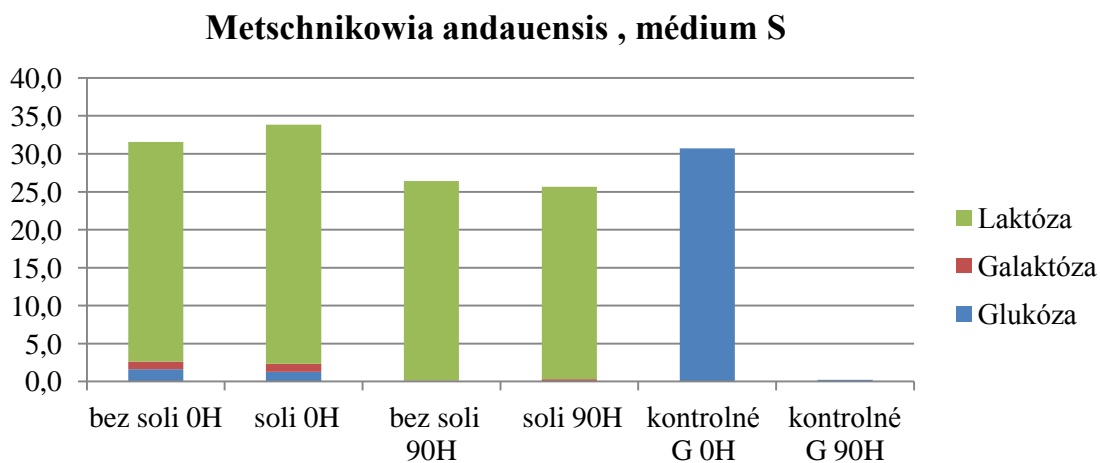
Obrázok 29 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia, s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce 50 % obsahu glukózy a 50 % laktózy obsiahnutej v srvátke



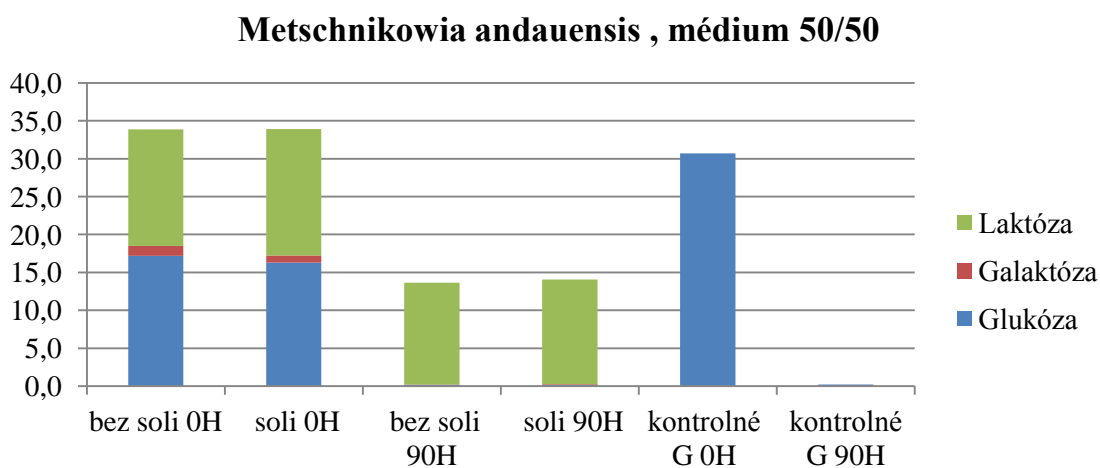
Obrázok 30 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce nedeproteinovanú hydrolyzovanú srvátku



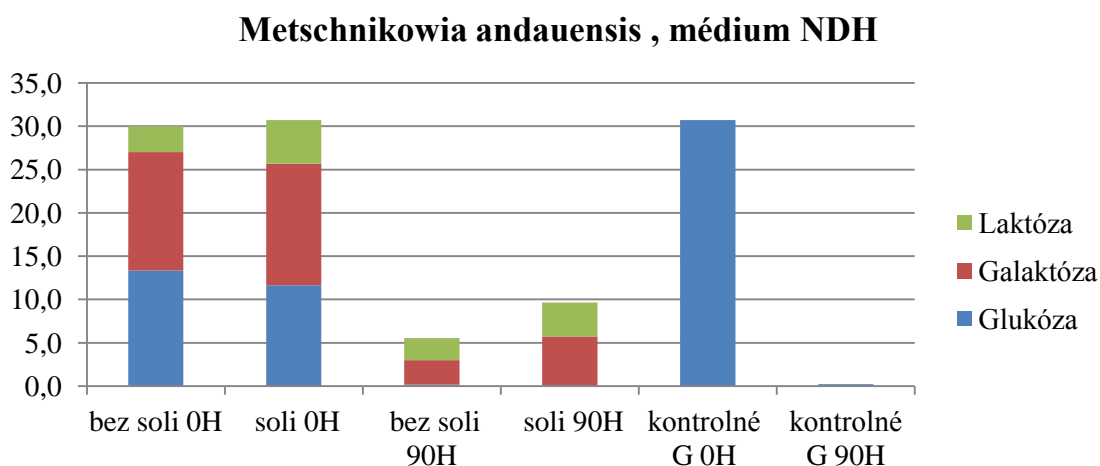
Obrázok 31 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia, s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce deproteinovanú hydrolyzovanú srvátku



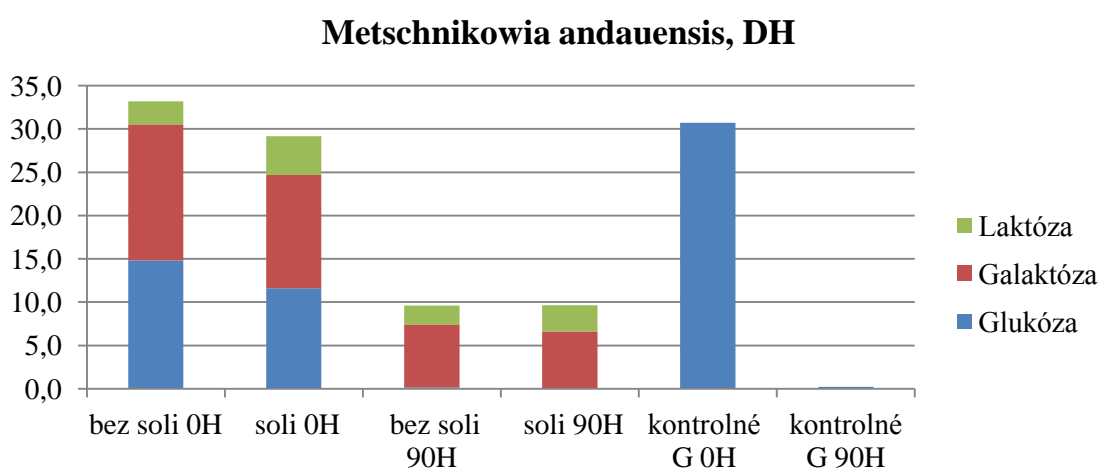
Obrázok 32 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce neupravenú srvátku



Obrázok 33 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce 50 % obsahu glukózy a 50 % laktózy obsiahnutej v srvátke

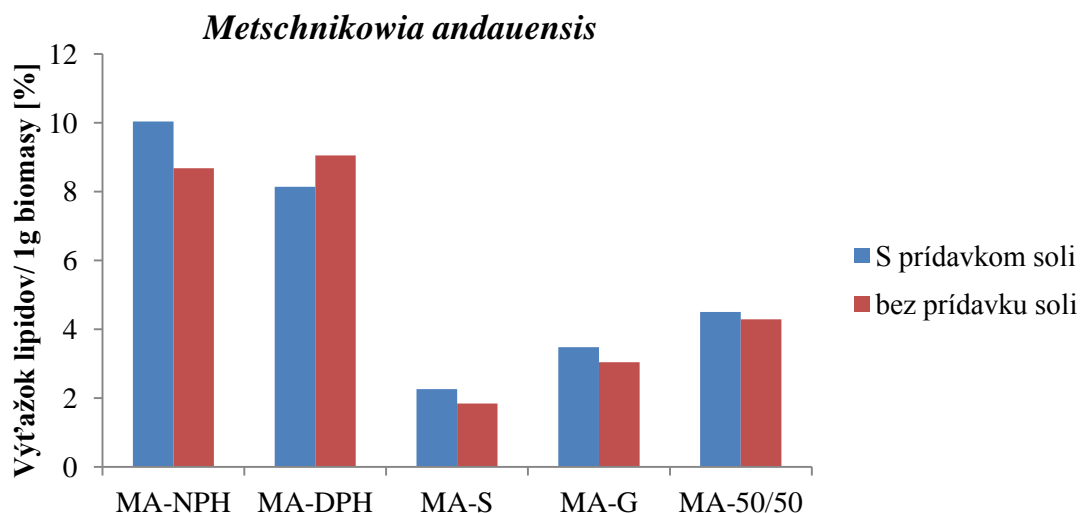


Obrázok 34 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce nedeproteinovanú hydrolyzovanú srvátku

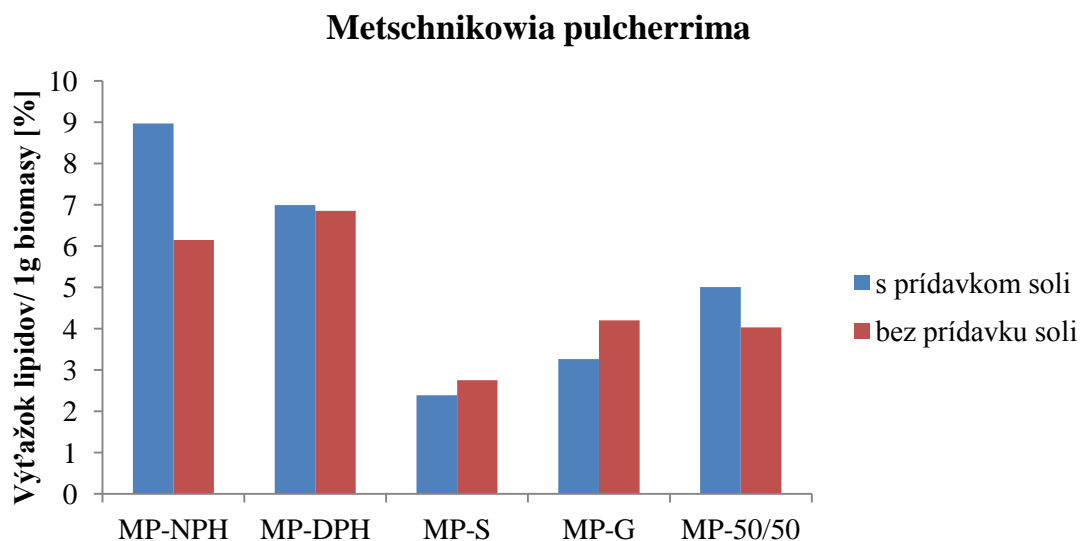


Obrázok 35 Graf znázorňujúci koncentrácie a zastúpenie jednotlivých sacharidov v čase 0 hod a 90 hod – kultivácia s prídavkom soli alebo bez prídavku soli, produkčné médium obsahujúce deproteinovanú hydrolyzovanú srvátku

Z grafov znázorňujúcich zmenu koncentračného zastúpenia jednotlivých sacharidov na začiatku kultivácie a po jej ukončení môžeme pozorovať, že vo všetkých prípadoch došlo k úplnej využitiu glukózy bez výnimky, zatiaľ čo v prípade galaktózy to tvrdiť nie je možné. V prípade oboch kmeňov, *M. andauensis* aj *M. pulcherrima*, nedochádza k úplnej využitiu galaktózy na hydrolyzovaných srvátkových médiách. K využitiu laktózy kvasinkami rodu *Metschnikowia* nedochádza vôbec, pretože tieto kvasinky nie sú vybavené enzýmami na štiepenie glykozidickej väzby v laktóze. Preto laktóza prítomná v srvátke nie je využiteľný zdroj uhlíka a energie pre tieto kvasinky a je nevyhnutné ju najprv hydrolyzovať.



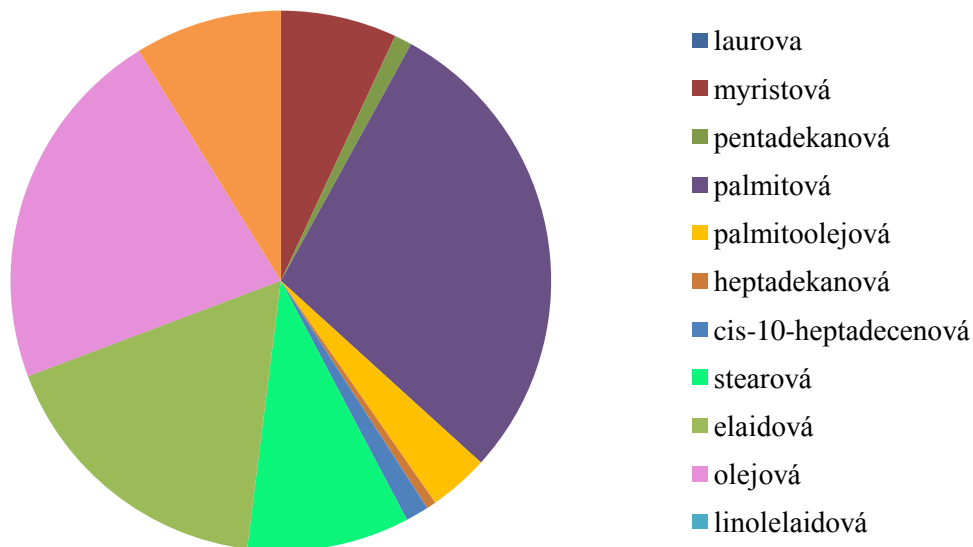
Obrázok 36 Porovnanie výťažku mikrobiálnych lipidov v rôznych srvátkových produkčných médiách, *Metschnikowia andauensis*-



Obrázok 37 Porovnanie výťažku mikrobiálnych lipidov v rôznych srvátkových produkčných médiách, *Metschnikowia pulcherrima*

Z grafov na Obrázok 36 a Obrázok 37 je viditeľné, že produkcia mikrobiálnych lipidov je poznamene vyššia v produkčných médiách s obsahom hydrolyzovanej srvátky. Najvyššia produkcia lipidov bola zaznamenaná pre druh *Metschnikowia andauensis* v produkčnom médiu nedeproteinovanej hydrolyzovanej srvátky s prídavkom soli., s výťažkom 10,04 % obsahu biomasy. V prípade produkčného média neupravovanej srvátky je akumulácia v oboch kmeňoch najnižšia, pretože kvasinky nie sú schopné spracovávať prítomnú laktózu a teda strádaajú zdroj uhlíka a energie.

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch *M.andauensis* , NDH so soľami



Obrázok 38 Zastúpenie jednotlivých lipidov vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s nedeproteinovanou hydrolyzovanou srvátkou

Analýzou extraktu lipidov z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s nedeproteinovanou hydrolyzovanou srvátkou bolo zistené percentuálne zastúpenie jednotlivých lipidov. Najväčšie percentuálne zastúpenie má práve kyselina palmitová a olejová a elaidová. Podľa literatúry majú najväčšie zastúpenie v mikrobiálnych lipidoch práve tieto mastné kyseliny. Percentuálne zastúpenie všetkých analyzovaných vzoriek sa nachádza v **Prílohe 3**.

5.5 Veľkokapacitná kultivácia v bioreaktore

Kultivácia kvasiniek rodu *Saccharomyces*, *Metschnikowia* a baktérii rodu *Lactobacillus* prebiehala podľa podmienok popísaných v kapitole 4.4.10 na prístroji New Brunswick typ Bio Flo/ CelliGen115 v objeme 1,5 l produkčného média.

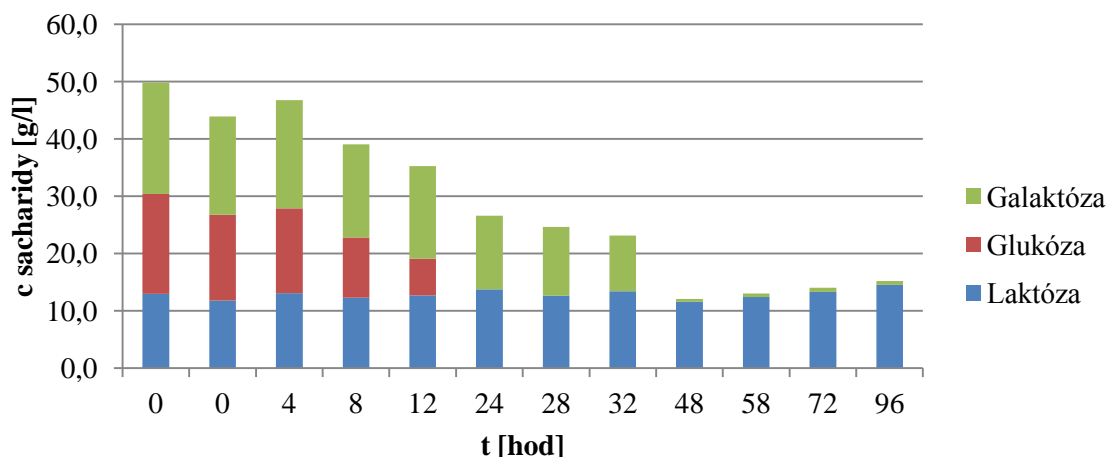


Obrázok 39 Fermentor New Brunswick typ Bio Flo/ CelliGen115 použitý pre kultiváciu kvasiniek rodu *Saccharomyces* a *Metschnikowia* a taktiež pre kultiváciu baktérii rodu *Lactobacillus*

5.5.1 Kultivácia *S.cerevisiae* 6646 na produkčnom médiu s obsahom nedeproteínovanej hydrolyzovanej srvátky

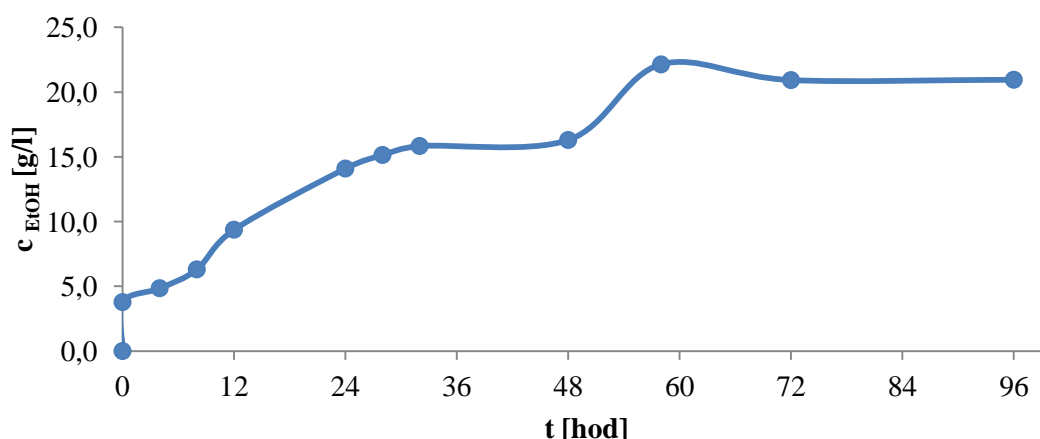
Z grafu na **Obrázok 40** je zreteľne, že v období prvých 24 hodín dochádza k takmer výhradnej spotrebe glukózy a teda zákonitosti, kedy najprv dochádza k využitiu najjednoduchšieho substrátu prítomného v médiu a až po jeho vyčerpaní dochádza k spotrebe ostatných prítomných substrátov. K využitiu laktózy nedochádza ani po spotrebe galaktózy v médiu z toho dôvodu, že kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* nie sú schopné utilizovať disacharid laktózu v dôsledku neprítomnosti enzýmov štiepiacich laktózu na jej monoméne jednotky, ktoré by sa mohli zúčastniť glykolýzy.

Kultivácia *S.cerevisiae* vo fermentore o objeme 1,5 l, spotreba sacharidov



Obrázok 40 Graf vyjadrujúci priebeh spotreby jednotlivých sacharidov počas kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média nedeproteinovanej hydrolyzovanej srvátky

Kultivácia *S.cerevisiae* vo fermentore o objeme 1,5 l, tvorba etanolu



Obrázok 41 Graf závislosti koncentrácie etanolu na čase, vyjadrujúci produkciu etanolu v priebehu kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média nedeproteinovanej hydrolyzovanej srvátky

V 48 hodine kultivácie sú vyčerpané všetky využiteľné sacharidy ako zdroj uhlíka. Predpoklad bol, že po vyčerpaní sacharidov ako zdroja uhlíka nedôjde aj k zastaveniu produkcie etanolu, avšak z grafu na Obrázok 41 je možné pozorovať nárast koncentrácie etanolu až do obdobia šesťdesiatej hodiny od začatia kultivácie. Táto skutočnosť poukazuje na fakt, že použitý druh kvasiniek okrem sacharidov s najväčšou pravdepodobnosťou využil nejaký sekundárny zdroj uhlíka pre svoje metabolické pochody a tvorbu etanolu. S najvyššou pravdepodobnosťou sekundárnym zdrojom uhlíka boli denaturované proteíny, ktoré sú prirodzene obsiahnuté v srvátke v pomerne hojnom zastúpení a z média po hydrolýze, pri ktorom došlo k ich vyzrážaniu, neboli odstránené. Konečná koncentrácia etanolu po kultivácii

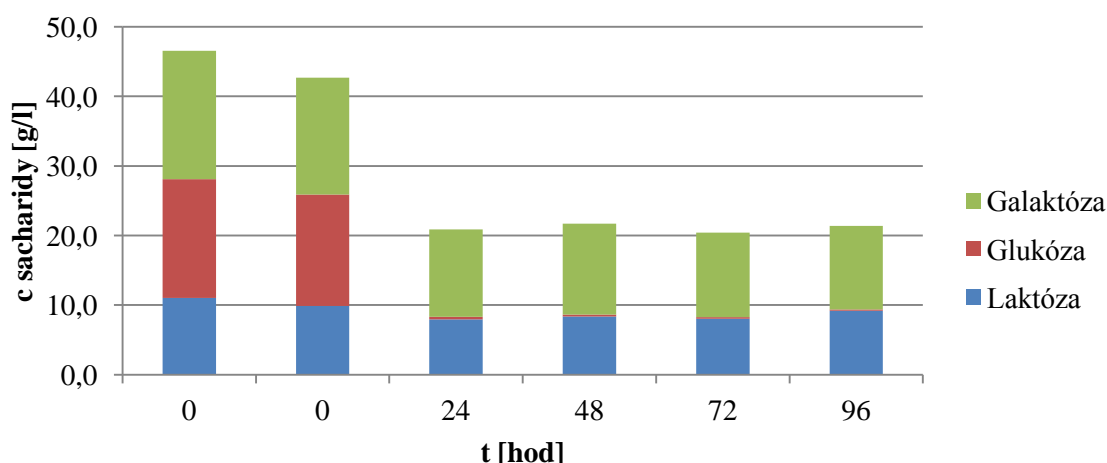
činila 20,95 g/l. Vypočítaná teoretická koncentrácia etanolu vyprodukovaná z využiteľných sacharidov prítomných v médiu činí 16,37 g/l, čo jasne podporuje hypotézu využitia sekundárneho zdroja uhlíka.

Faktor etanolovej výťažnosti, $Y_{P/S}$, (g/g), pre kultiváciu v bioreaktore s produkčným médiom hydrolyzovaná nedepteinovaná srvátka, doba kultivácie 96 hod, je 0,667 g/g.

5.5.2 Kultivácia *M. andauensis* na produkčnom médiu nedepteinovanej hydrolyzovanej srvátky

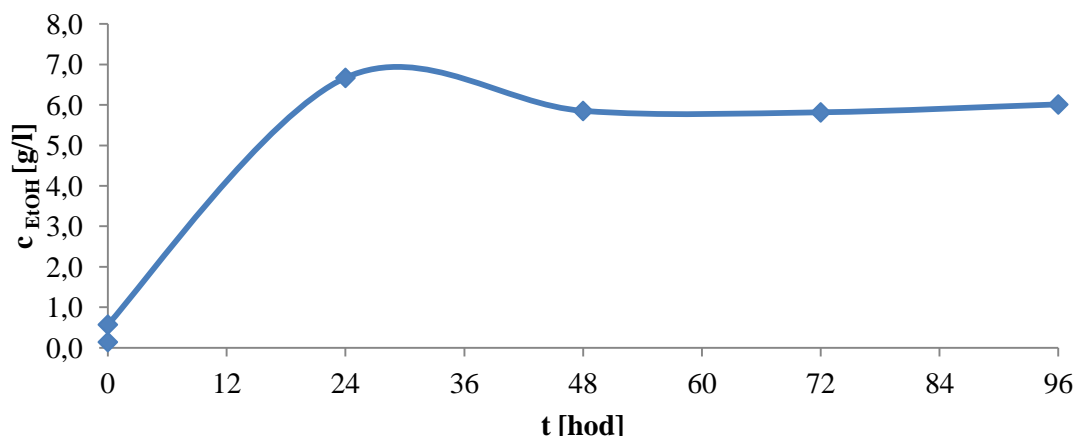
Rovnako ako v prípade *S. cerevisiae* ani u kvasiniek rodu *Mestchnikowia* nedochádza k využitiu laktózy ani po spotrebe galaktózy v médiu. Je to z dôvodu, že kvasinky tohto rodu nie sú schopné využívať disacharid laktózu v dôsledku neprítomnosti enzýmov štiepajúcich laktózu na jej monomérmne jednotky, ktoré by sa mohli zúčastniť glykolýzy. Z grafu na **Obrázok 42** je tak ako v predchádzajúcom prípade jasne pozorované, že v období prvých 24 hodín kultivácie dochádza k výhradnej spotrebe glukózy a teda k uplatneniu rovnakého efektu využitia najjednoduchšieho prítomného substrátu a až po jeho vyčerpaní dochádza k spotrebe ostatných prítomných substrátov. Avšak v prípade kvasinky druhu *M. pulcherrima* dochádza len k minimálnej spotrebe galaktózy, a to približne 4 g/l a zvyšná galaktóza prítomná v produkčnom médiu zostáva nevyužitá. To odpovedá aj množstvu vyprodukovaného etanolu, ktorý dosahuje svojej hornej hranice presne v období vyčerpania glukózy z média (**Príloha 2**). Skutočnosť, že *M. pulcherrima* produkovala za aeróbnych podmienok etanol, poukazuje na uplatnenie Crabtreeho efektu, ktorý hovorí, že pri nadbytku substrátu odchádza k prepnutiu aeróbného metabolizmu na fermentáciu.

Kultivácia *M. pulcherrima* vo fermentore o objeme 1,5 l, spotreba sacharidov



Obrázok 42 Graf vyjadrujúci závislosť koncentrácie sacharidov prítomných v produkčnom médiu na čase popisujúci priebeh spotreby jednotlivých sacharidov počas kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média nedepteinovanej hydrolyzovanej srvátky s prídavkom soli

Kultivácia *M.pulcherrima* vo fermentore o objeme 1,5 l, tvorba etanolu



Obrázok 43 Graf závislosti koncentrácie etanolu na čase, vyjadrujúci produkciu etanolu v priebehu kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média nedeproteinovanej hydrolyzovanej srvátky s prídavkom soli

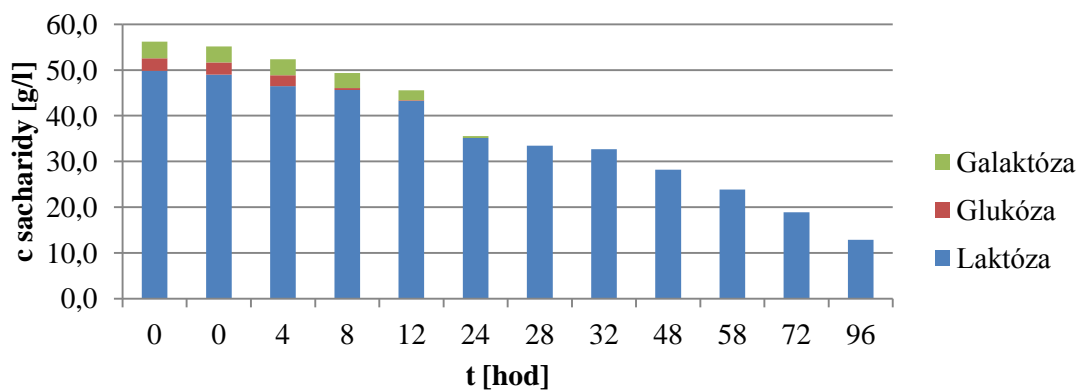
Tabuľka 13 Množstvo lipidov vztiahnuté na 1 gram biomasy vyprodukovaných počas kultivácie v bioreaktore pri teplote 25 °C a aeróbných podmienkach

Hodina kultivácie	Lipidy (g/g biomasy)	percentuálne zastúpenie (%)
72	0,0743	7,43
96	0,1291	12,91

Hlavným cieľom kultivácie kvasiniek rodu *Metschnikowia* bol zisk mikrobiálnych lipidov. Z výsledkov gravimetrického stanovenia obsahu lipidov, je možné konštatovať, že v prípade kultivácie *M.andauensis* v bioreaktore bol po 96 hodinovej kultivácii dosiahnutý uspokojivý výťažok, vid' **Tabuľka 13**. Tieto výsledky poukazujú na skutočnosť, že kvasinka *M.andauensis* patrí medzi kvasinky schopné pri stresových podmienkach akumulovať lipidy ako formu zásobnej látky. Podľa odbornej literatúry boli, pre kvasinku rovnakého rodu, *M.pulcherrima*, dosiahnuté výťažky produkcie stresových lipidov až do výšky 40 % hmotnosti, avšak kultivácia bola prevedená pri nižších teplotách. Autori práce taktiež porovnávali množstvo akumulovaných lipidov pri rôznych teplotách a práve pri nižších teplotách (20 °C a 15 °C) boli dosiahnuté vyššie výťažky a lepší rast buniek. Pri teplote 25 °C, rovnakej ako bola zvolená v predloženej práci, dosiahli autori porovnateľné výťažky lipidov. Z toho je možné usúdiť, že zvolená kultivačná teplota teda bola jedným z faktorov ovplyvňujúcich výťažnosť [41].

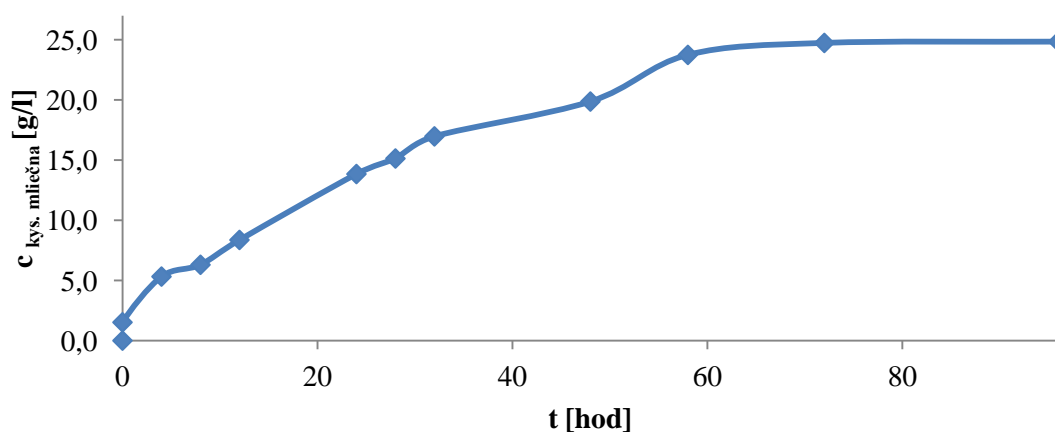
5.5.3 Kultivácia *L. plantarum* na produkčnom médiu neupravovanej srvátky s prídavkom soli

Kultivácia *L. plantarum* vo fermentore o objeme 1,5 l produkčného média, spotreba sacharidov



Obrázok 44 Graf vyjadrujúci závislosť koncentrácie sacharidov prítomných v produkčnom médiu na čase popisujúci priebeh spotreby jednotlivých sacharidov počas kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média neupravovanej srvátky s prídavkom soli

Kultivácia *L. plantarum* vo fermentore o objeme 1,5 l produkčného média, tvorba kyseliny mliečnej



Obrázok 45 Graf závislosti koncentrácie kyseliny mliečnej na čase, vyjadrujúci produkciu kyseliny mliečnej v priebehu kultivácie v bioreaktore v 1,5 l produkčného média neupravovanej srvátky s prídavkom soli

Rovnako ako v ostatných prípade kultivácie, aj v tomto prípade došlo najprv k utilizácii jednoduchých cukrov, glukózy a následne galaktózy, vid'. Graf závislosti koncentrácie sacharidov na čase (Obrázok 45). Po skvasení všetkých dostupných monosacharidických jednotiek je možné zreteľne pozorovať utilizáciu prítomnej laktózy, pretože baktérie rodu *Lactobacillus* patria do skupiny mikroorganizmov vybavených enzýmami pre štiepenie glykozidickej väzby a teda sú schopné štiepiť laktózu na jej monoméne jednotky. S úbytkom sacharidov v médiu dochádza k nárastu koncentrácie laktózy, ktorej konečná koncentrácia v 96. hodine bola 24,86 g/l avšak nedošlo k vyčerpaniu všetkých prítomných sacharidov z média.

6 ZÁVER

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo posúdenie možnosti biotechnologického využitia odpadného produktu srvátka. Za týmto účelom bol prevedený screening mikrobiálnych producentov vybraných priemyslovo významných metabolitov. V rámci práce bola taktiež optimalizovaná charakterizácia a spracovanie srvátky a príprava médií s obsahom srvátky. Následne bola prevedená kultivácia a vyhodnotenie výťažku požadovaných metabolitov a spotreby substrátu.

V experimentálnej časti bola charakterizovaná použitá srvátka spracovaná reverznou osmózou. Vyznačovala sa vysokým obsahom sacharidov, až 65 %. Okrem vysokého podielu sacharidov lyofilizovaná srvátka obsahovala aj 14,3 % proteínov, 0,9 % tukov a 1,6 % vlhkosti. Tento odpadný substrát môže slúžiť súčasne ako zdroj uhlíka aj dusíka. Z optimalizácie podmienok hydrolýzy laktózy bolo zistené, že najlepšej kyslej hydrolýzy sa použitím kyseliny chlorovodíkovej sa dosiahlo použitím koncentrácie 0,933 mol/l.

Zo screeningu mikrobiálnych producentov priemyslovo významných metabolitov na rôznych srvátkových médiách sa ukázalo, že najvyššiu produkciu etanolu dosiahli kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* 6646 na produkčnom médiu s obsahom hydrolyzovanej nedeproteinovanej srvátky bez prídavku soli. Najvyššia produkcia kyseliny mliečnej sa dosiahla použitím baktérie *Lactobacillus plantarum* na produkčnom médiu z neupravovanej srvátky s prídavkom soli. Z vybraných producentov mikrobiálnych lipidov najvyššiu produkciu dosahovala *Metschnikowia andauensis* a opätovne ako v prípade *S.cerevisiae* na produkčnom médiu s obsahom hydrolyzovanej nedeproteinovanej srvátky, avšak s prídavkom soli.

Na kultiváciu do bioreaktora boli vybrané kmene mikroorganizmov s najvyšším výťažkom na príslušnom produkčnom médiu obsahujúcom srvátku. Kultiváciou *Saccharomyces cerevisiae* v bioreaktore za anaerobných podmienok sa dosiahol výťažok etanolu 20,95 g/l, čo výrazne prevyšuje teoretickú koncentráciu etanolu (16,37 g/l) a tým pádom poukazuje a využitie sekundárneho zdroja uhlíka okrem sacharidov. *Lactobacillus plantarum* kultiváciou v bioreaktore dosiahol hodnotu koncentrácie kyseliny mliečnej 24,86 g/l. Kultivácia *Metschnikowia andauensis* v bioreaktore bola vykonaná za účelom produkcie mikrobiálnych lipidov. Akumulácia lipidov na srvátkovom produkčnom médiu pri teplote kultivácie 25 °C činila 13 %, čo je hodnota porovnateľná s výťažkami dosiahnutými v publikovanej literatúre pre kvasinku rovnakého rodu.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ROEHR, Max. *Biotechnology: Products of Primary Metabolism*. 2nd, compl. revised Edit. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1996. ISBN 3527283161
- [2] PRAZERES, Ana R., Fátima CARVALHO a Javier RIVAS. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* [online]. 2012, **110**, 48-68 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018. ISSN 03014797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479712002769>
- [3] RYAN, Michael P. a Gary WALSH. The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2016, **15**(3), 479-498 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1007/s11157-016-9402-1. ISSN 1569-1705. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-016-9402-1>
- [4] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.
- [5] PANESAR, Parmjit S. a John F. KENNEDY. Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2011, **32**(4), 327-348 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.3109/07388551.2011.640624. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2011.640624>
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 8020006001.
- [7] JASKO, Janis, Eriks SKRIPSTS, Vilis DUBROVSKIS, Eduards ZABAROVSKIS a Vladimirs KOTELNECS. Biogas production from cheese whey in two phase anaerobic digestion. In: *Engineering for Rural Development* [online]. 2011, s. 373-376 [cit. 2017-02-12]. ISSN 16913043. Dostupné z: http://tf.llu.lv/conference/proceedings2011/Papers/069_Jasko.pdf
- [8] GUIMARÃES, Pedro M.R., José A. TEIXEIRA a Lucília DOMINGUES. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* [online]. 2010, **28**(3), 375-384 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.002. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975010000224>
- [9] GAJENDRAGADKAR, Chinmay N. a Parag R. GOGATE. Ultrasound assisted acid catalyzed lactose hydrolysis: Understanding into effect of operating parameters and scale up studies. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2017, **37**, 9-15 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.12.029. ISSN 13504177. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417716304680>
- [10] COTÉ, A., W.A. BROWN, D. CAMERON a G.P. VAN WALSUM. Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol. *Journal of Dairy Science* [online]. 2004, **87**(6), 1608-1620 [cit. 2017-02-12]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73315-9. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030204733159>
- [11] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.
- [12] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [13] CARRASCOSA SANTIAGO, Alfonso V., Rosario. MUÑOZ a Ramón. GONZÁLEZ

- GARCIA. *Molecular wine microbiology*. Boston: Academic Press, 2011. ISBN 0123750210.
- [14] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-7080-534-X. Dostupné z : http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-534-X/pages-pdf/001.html
- [15] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
- [16] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. ISBN 80-214-3057-5.
- [17] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [18] Glykolýza - čo sa to v tom cytosole deje? *Biopedia* [online]. Libor Sokoli, 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://www.biopedia.sk/bunka/glykolyza-co-sa-to-v-tom-cytosole-deje>
- [19] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-341-9.
- [20] FELL, J.W., KURTZMAN, C. P. a Jack W. FELL, ed. *Yeasts: a taxonomic study*. 5th ed London : Elsevier, 2011. ISBN 978-0-123-84708-9.
- [21] PANESAR, P, J KENNEDY, D GANDHI a K BUNKO. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* [online]. 2007, **105**(1), 1-14 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.035. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607002816>.
- [22] MAKAROVA, K., A. SLESAREV, Y. WOLF, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(42), 15611-15616 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1073/pnas.0607117103. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607117103>.
- [23] ŠIMONOVICHOVÁ, Alexandra, Elena PIECKOVÁ, Peter FERIANEC, Peter HANAJÍK a Rozália HORVÁTH. *Environmentálna mikrobiológia*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2013. ISBN 978-80-223-3382-5. Dostupné z: <http://fns.uniba.sk/?id=9004>
- [24] HUDECOVÁ, Daniela a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2002. Edícia skript. ISBN 80-227-1663-4.
- [25] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, c1998. ISBN 8090290604.
- [26] JUTURU, Veeresh a Jin Chuan WU. Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2015, **36**(6), 967-977 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1066305>
- [27] PANESAR, P, J KENNEDY, D GANDHI a K BUNKO. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* [online]. 2007, **105**(1), 1-14 [cit. 2017-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.035. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607002816>
- [28] REHM, Hans-Jürgen. a Gerald REED. *Biotechnology / Volume 7, Products of secondary metabolism*. 2nd rev. ed. Weinheim: VCH, 1997, xiv, 728 s. ISBN 3-527-

- 28317-X.
- [29] OCHSENREITHER, Katrin, Claudia GLÜCK, Timo STRESSLER, Lutz FISCHER a Christoph SYLDATK. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**, - [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01539. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01539>
 - [30] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6
 - [31] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
 - [32] MEULLEMIESTRE, Alice, Cassandra BREIL, Maryline ABERT-VIAN a Farid CHEMAT. *Modern Techniques and Solvents for the Extraction of Microbial Oils* [online]. 1. Springer International Publishing, 2015 [cit. 2017-04-17]. ISBN 978-3-319-22717-7. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=tvduCgAAQBAJ&hl=sk&source=gbs_navlinks_s
 - [33] FOLCH, Jordi, M LEES a J.G SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957, **226**(1), 497-509
 - [34] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
 - [35] YASHIN, Ya. I. a A. Ya. YASHIN. *Liquid Chromatography. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Elsevier, 2012, s. 285-310. DOI: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00010-8. ISBN 9780123848628
 - [36] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
 - [37] MUSSATTO, Solange I., Ercília M.S. MACHADO, Livia M. CARNEIRO a José A. TEIXEIRA. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy* [online]. 2012, **92**, 763-768 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.08.020. ISSN 03062619. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261911005162>
 - [38] SUBRAMANIAM, Ramalingam, Stephen DUFRECHE, Mark ZAPPI a Rakesh BAJPAI. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2010, **37**(12), 1271-1287 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1007/s10295-010-0884-5. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-010-0884-5>
 - [39] NAIK, S.N., Vaibhav V. GOUD, Prasant K. ROUT a Ajay K. DALAI. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, **14**(2), 578-597 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.003. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002342>
 - [40] Biofuels : What are they? *Biofuel.org.uk* [online]. 2010 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z:

<http://biofuel.org.uk/>

- [41] SANTAMAURO, Fabio, Fraeya M WHIFFIN, Rod J SCOTT a Christopher J CHUCK. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2014, 7(1), 34- [cit. 2017-05-17]. DOI: 10.1186/1754-6834-7-34. ISSN 1754-6834.
Dostupné z:
<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-7-34>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADP	Adenozíndifosfát
AMP	Adenozínmonofosfát
ATP	Adenozíntrifosfát
BOD	Biochemická spotreba kyslíka
COD	Chemická spotreba kyslíka
DAD	Detektor s diodovým poľom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMP	Embden-Meyerhof Parnasová dráha
EP	Endoplazmatické retikulum
EU	Európska únia
FID	Plameňovo ionizačný detektor
GLC	Gas-liquid chromatography/ plynova-kvapalinová chromatografia
GMO	Genetický modifikovaný organizmus
GRAS	Generally regarded as safe/ Všeobecne považovaný za bezpečný
GSC	Gas-solid chromatography/ plynova-pevná látka chromatografia
HILIC	Kvapalinová chromatografia s hydrofilnými interakciami
HPLC	Vysokotlaká kvapalinová chromatografia/ Vysokoúčinná kvapalinová ch.
HSP	Teplotne šokové proteíny
LA	Kyselina mliečna
NADH	Nikotínamidadenín dinukleotid
NADPH	Nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NPD	Dusíkovo-fosforový detektor
PDA	Detektor s diodového poľa
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)/ kopolmér kyseliny mliečnej a glykolovej
SCO	single cells oil
TAG	triacylglycerol
TCD	Tepelne vodivostný detektor
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV	Ultrafialové žiarenie

9 PRÍLOHY

Príloha 1: Rastové charakteristiky

1A *Namerané hodnoty absorbanice v závislosti na dĺžke kultivácie, S.cerevisiae 6646*

čas (hod)	Riedenie	A	A (po prepočte)
0	0x	0,08	0,008
3	0x	0,16	0,016
6	0x	0,63	0,063
9	.atd	0,43	0,425
12	10x	0,74	0,740
15	20x	0,64	0,640
18	20x	0,64	0,640
21	20x	0,65	0,645
24	20x	0,62	0,635
27	20x	0,66	0,665
30	20x	0,67	0,625
33	20x	0,63	0,655
36	20x	0,66	0,655

1B *Namerané hodnoty absorbanice v závislosti na dobe dĺžke kultivácie, S. cerevisiae 6651*

čas (hod)	Riedenie	A	A (po prepočte)
0	0x	0,07	0,007
3	0x	0,09	0,009
6	0x	0,16	0,016
9	0x	0,49	0,049
12	5x	0,28	0,141
15	10x	0,45	0,450
18	10x	0,72	0,720
21	10x	0,81	0,810
24	10x	0,80	0,815
27	10x	0,83	0,820
30	10x	0,82	0,800
33	10x	0,80	0,880
36	10x	0,88	0,815

1C Namerané hodnoty absorbanice v závislosti na dobe dĺžke kultiváci, *M. andauensis*

čas (hod)	Riedenie	A	A (po prepočte)
0	0x	0,13	0,009
3	0x	0,24	0,016
6	0x	0,36	0,024
9	10x	0,19	0,123
12	10x	0,56	0,370
15	10x	0,84	0,557
18	10x	0,91	0,603
21	10x	0,92	0,613
24	10x	0,95	0,633
27	15x	0,74	0,735
30	15x	0,77	0,765
33	15x	0,81	0,805
36	15x	0,79	0,785
39	15x	0,81	0,810
42	15x	0,815	0,815
45	15x	0,84	0,840
48	15x	0,85	0,850

1D Namerané hodnoty absorbanice v závislosti na dobe dĺžke kultivácie, *M. pulcherrima*

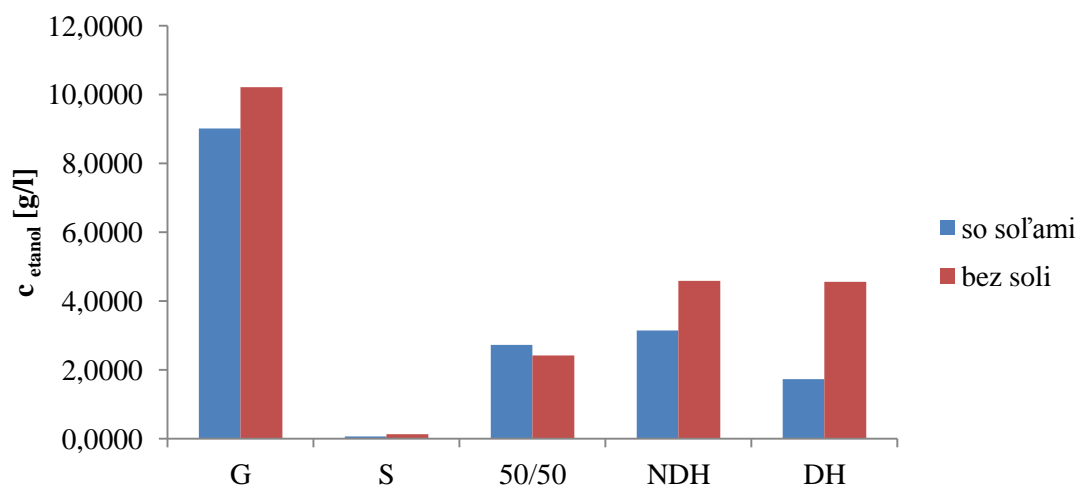
čas (hod)	Riedenie	A	A (po prepočte)
0	0x	0,13	0,009
3	0x	0,20	0,013
6	0x	0,44	0,029
9	0x	0,71	0,047
12	10x	0,45	0,297
15	10x	0,71	0,473
18	10x	0,89	0,590
21	10x	0,89	0,593
24	10x	0,92	0,613
27	15x	0,67	0,665
30	15x	0,67	0,670
33	15x	0,71	0,705
36	15x	0,75	0,748
39	15x	0,82	0,820
42	15x	0,83	0,825
45	15x	0,86	0,855
48	15x	0,85	0,845

1E *Namerané hodnoty absorbanice v závislosti na dobe dĺžke kultivácie, L. plantarum*

čas (hod)	Riedenie	A	A (po prepočte)
0	0x	0,07	0,007
2	0x	0,08	0,008
4	0x	0,08	0,008
6	0x	0,1	0,01
8	0x	0,17	0,017
10	0x	0,49	0,049
12	10x	0,47	0,47
14	10x	0,63	0,63
16	10x	0,79	0,79
18	10x	0,77	0,77
20	10x	0,77	0,77
22	10x	0,71	0,71
24	10x	0,7	0,7
26	10x	0,75	0,75
28	10x	0,74	0,74
30	10x	0,74	0,74
32	10x	0,73	0,73
34	10x	0,73	0,73
36	10x	0,71	0,71
38	10x	0,72	0,72
40	10x	0,72	0,72
42	10x	0,74	0,74
44	10x	0,73	0,73
46	10x	0,72	0,72
48	10x	0,73	0,73

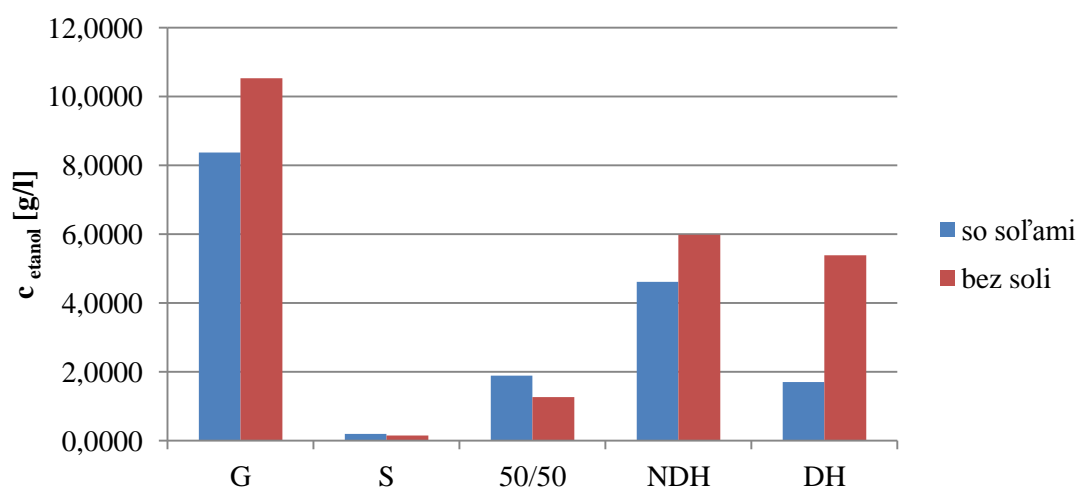
Príloha 2: Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Metschnikowia pulcherrima, etanol, v čase 90 hod



2A Koncentrácia etanolu v čase 90hodín stanovená pre jednotlivé srvátkové média a v porovnaní medzi produkciou s prídavkom a bez prídavku soli do produkčného média.

Metschnikowia andauensis, etanol, v čase 90 hod

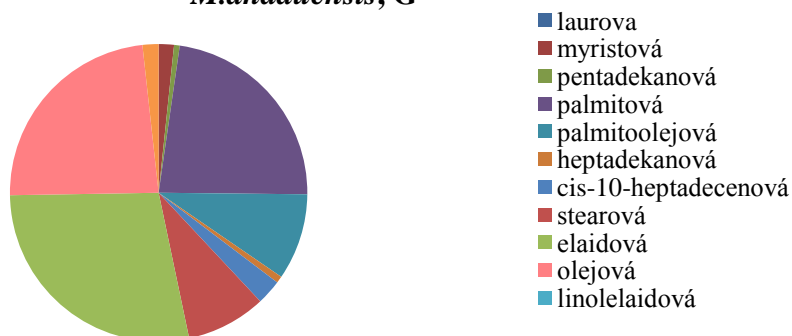


2B Koncentrácia etanolu v čase 90hodín stanovená pre jednotlivé srvátkové média a v porovnaní medzi produkciou s prídavkom a bez prídavku soli do produkčného média.

Príloha 3: Percentuálne zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch kvasiniek rodu *Metschnikowia*

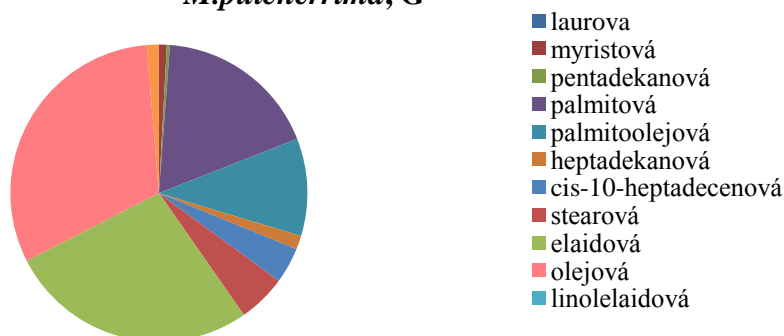
3A: Zastúpenie mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* a *M.pulcherrima* kultivovaných na glukózovom produkčnom médiu

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v *M.andauensis*, G



Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na glukózovom produkčnom médiu.

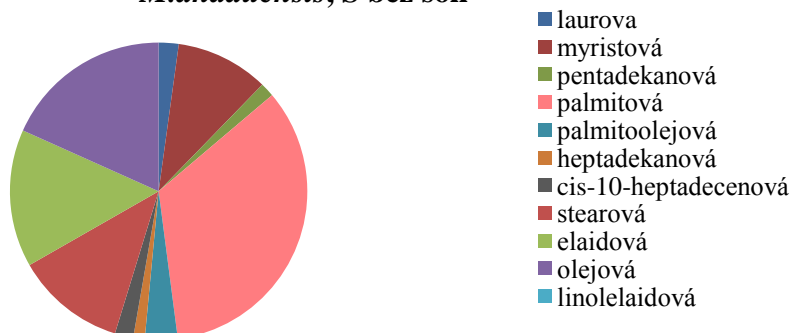
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v *M.pulcherrima*, G



Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na glukózovom produkčnom médiu.

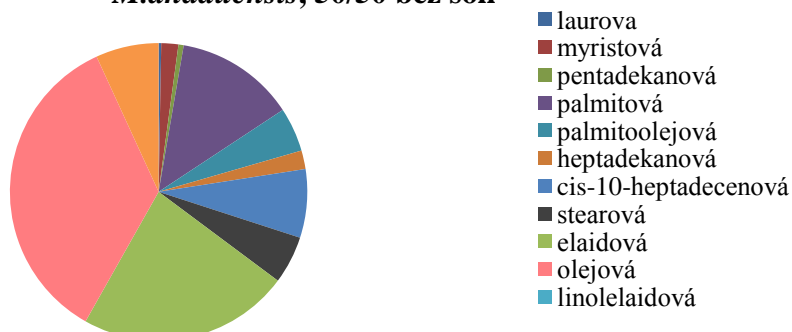
3B: Zastúpenie mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* a *M.pulcherrima* kultivovaných na srvátkovom produkčnom médiu bez solí

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v *M.andauensis*, S bez soli



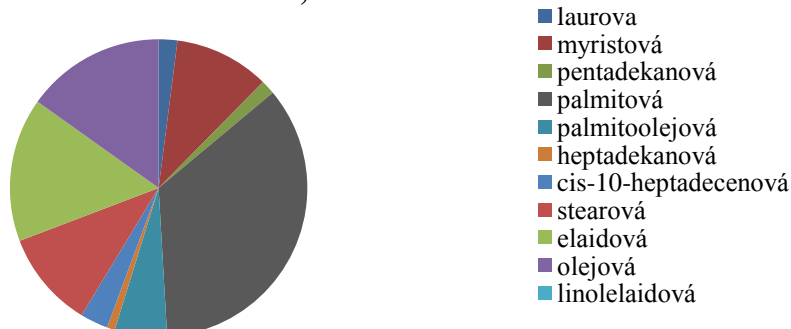
*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s neupravovanou srvátkou*

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v *M.andauensis*, 50/50 bez soli



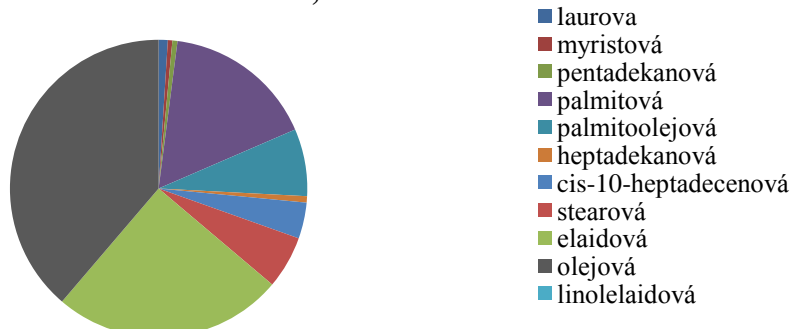
*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s 50 % koncentrácie glukózy a 50 % koncentrácie laktózy v srvátke*

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v
M.andauensis, NDH bez soli**



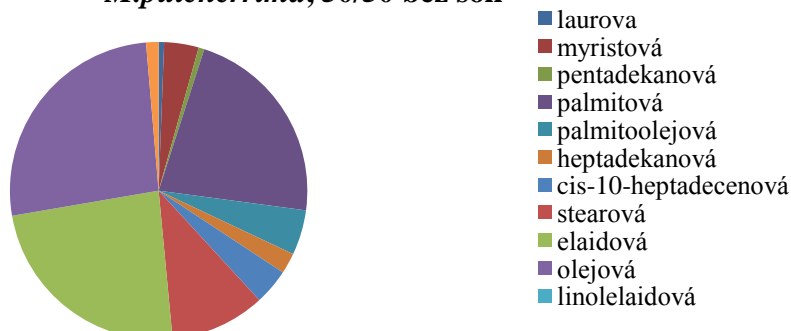
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s nedepróteínovanou hydrolyzovanou srvátkou

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v
M.andauensis, DH bez soli**



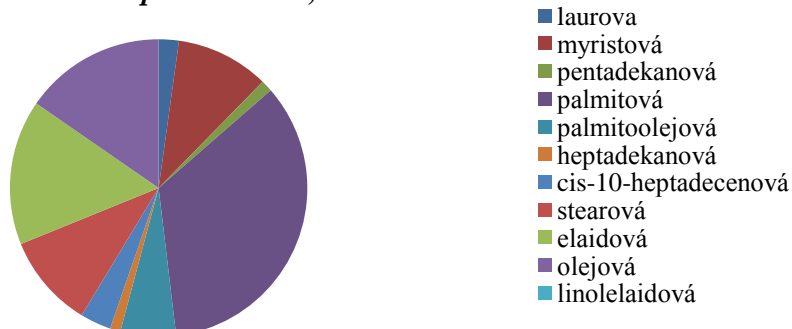
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s deproteínovanou hydrolyzovanou srvátkou

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch v
M.pulcherrima, 50/50 bez soli**



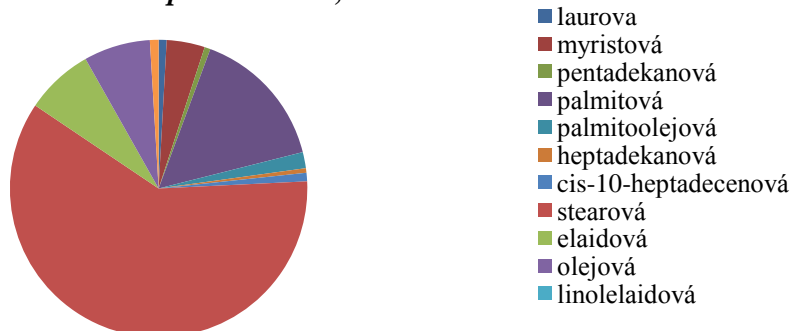
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s 50 % koncentrácie glukózy a 50 % koncentrácie laktózy v srvátke

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch
M.pulcherrima, NDH bez soli**



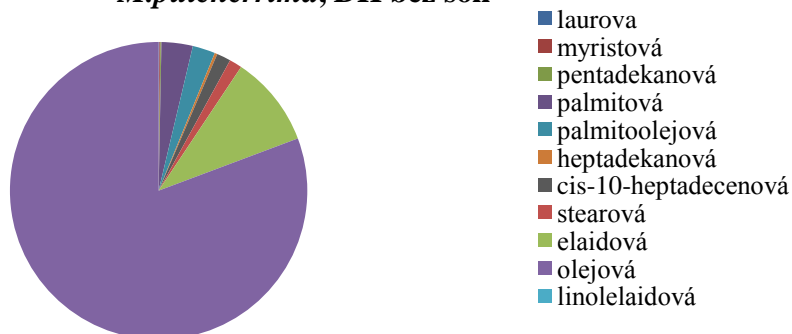
*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na produkčnom médiu s nedepróteínovanou hydrolyzovanou srvátkou*

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, S bez soli**



*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na produkčnom médiu s neupravovanou srvátkou*

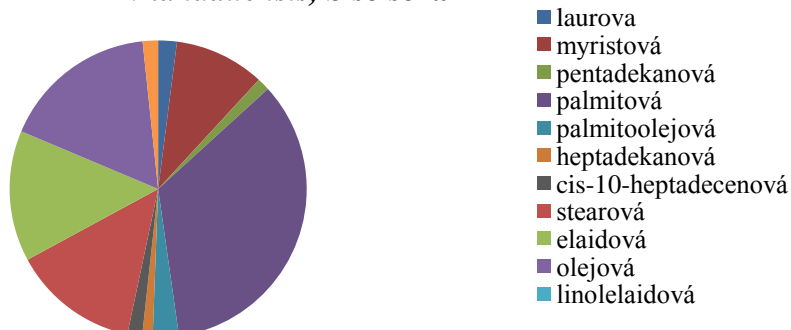
**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, DH bez soli**



*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na produkčnom médiu s depróteínovanou hydrolyzovanou srvátkou*

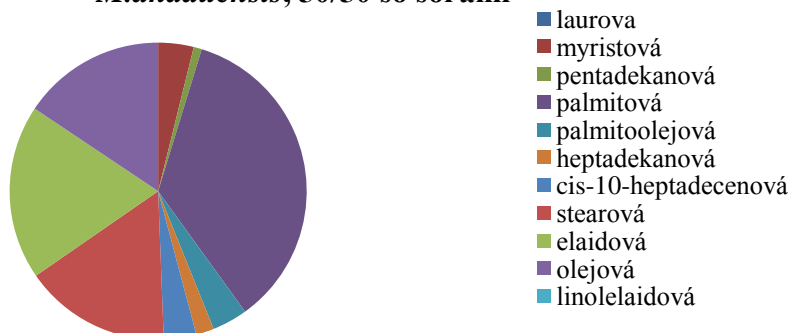
3C: Zastúpenie mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* a *M.pulcherrima* kultivovaných na srvátkovom produkčnom médiu s prídavkom soli

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u *M.andauensis*, S soľami



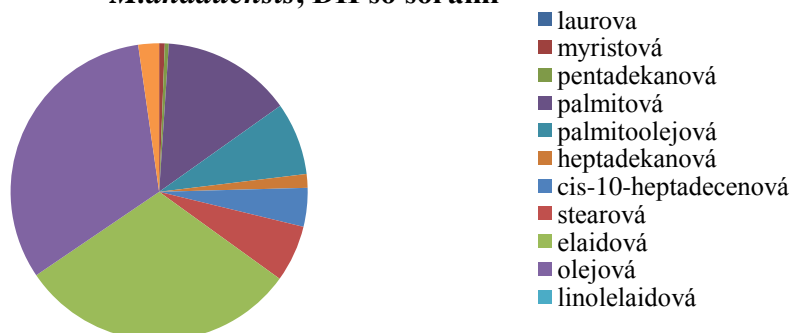
*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s neupravovanou srvátkou*

Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u *M.andauensis*, 50/50 soľami



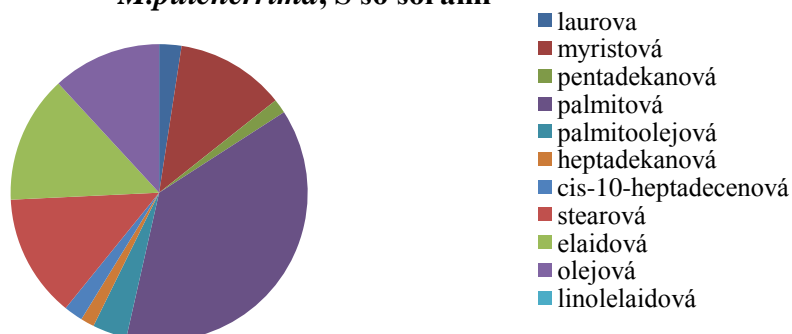
*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.andauensis* kultivovaných na produkčnom médiu s 50 % koncentrácie glukózy a 50 % koncentrácie laktózy v srvátke*

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.andaensis, DH so soľami**



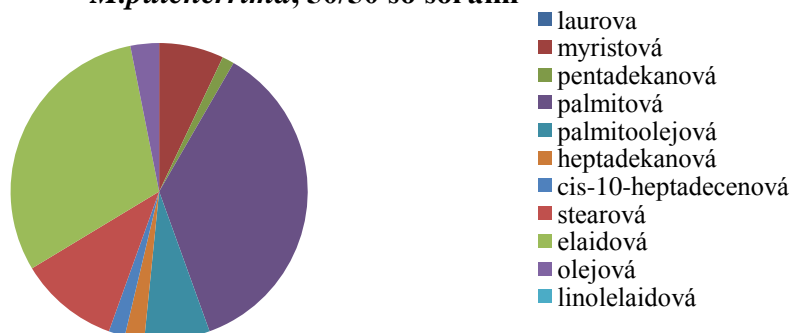
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s deproteínovanou hydrolyzovanou srvátkou

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, S so soľami**



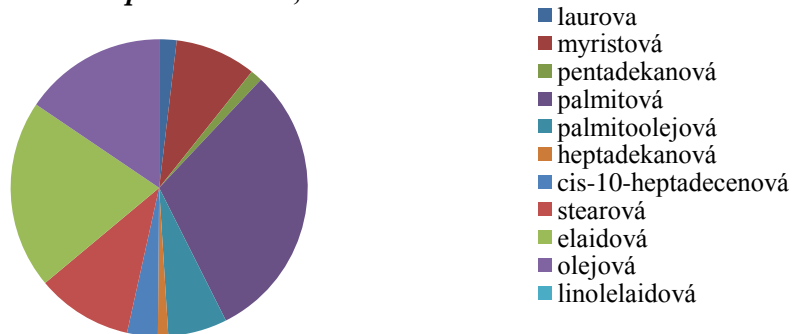
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s neupravovanou srvátkou

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, 50/50 so soľami**



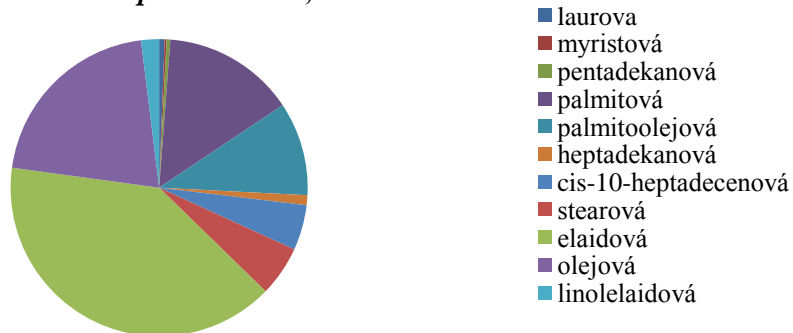
Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek M.pulcherrima kultivovaných na produkčnom médiu s 50 % koncentrácie glukózy a 50 % koncentrácie laktózy v srvátke

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, NDH so soľami**



*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na produkčnom médiu s nedepróteínovanou hydrolyzovanou srvátkou*

**Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch u
M.pulcherrima, DH so soľami**



*Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch vyextrahovaných z buniek *M.pulcherrima* kultivovaných na produkčnom médiu s depróteínovanou hydrolyzovanou srvátkou*